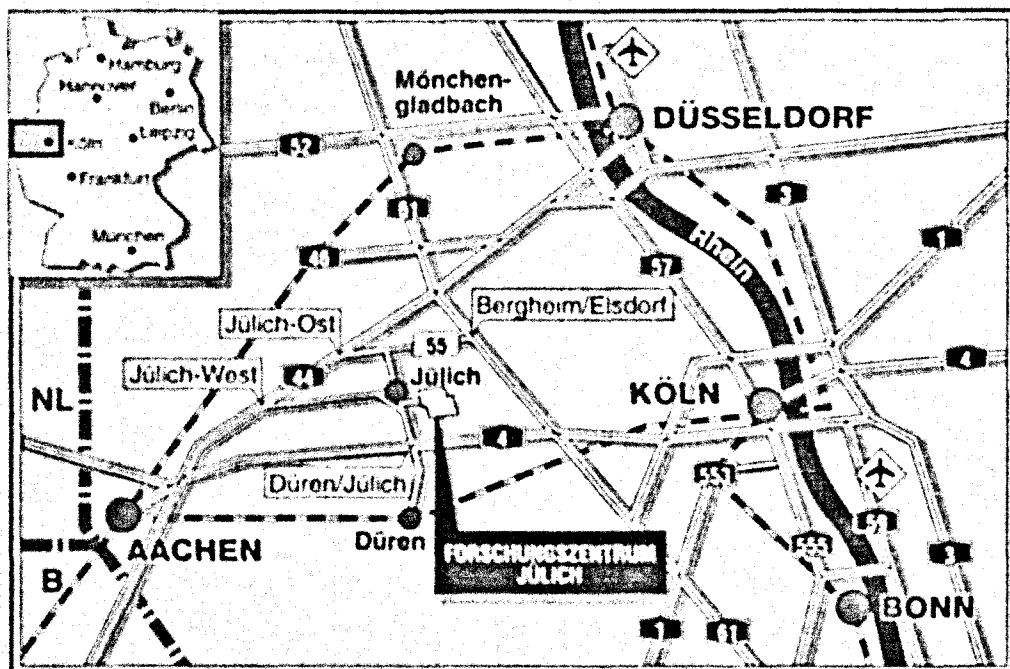




Institut für Biologische Informationsverarbeitung

***Molekulare Determinanten für Ca^{2+} -
Blockierung und Ca^{2+} -Permeabilität
in zyklisch Nukleotid-gesteuerten
Ionenkanälen***

Reinhard Gottfried Seifert



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3362
 ISSN 0944-2952
 Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3362
 D38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
 D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
 ☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

***Molekulare Determinanten für Ca^{2+} -
Blockierung und Ca^{2+} -Permeabilität
in zyklisch Nukleotid-gesteuerten
Ionenkanälen***

Reinhard Gottfried Seifert

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	IV
II	Kode der Aminosäuren	VI
1	Einleitung	1
1.1	Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle: Vorkommen und Aufbau	1
1.2	Strukturelle Eigenschaften der α - und der β -Untereinheiten	3
1.3	Die Bedeutung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit von cng-Kanälen	5
2	Material und Methoden	7
2.1	Patch-Clamp-Technik	7
2.2	Expressionssysteme	9
2.2.1	Vorbereitung der Oozyten	9
2.3	Lösungen	10
2.3.1	Inkubationslösungen für Oozyten	10
2.3.2	Meßlösungen	11
2.4	Eichung der Ca^{2+} -Konzentration	12
2.4.1	Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit einer Ca^{2+} -selektiven Elektrode	13
2.4.2	Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Arsenazo III	14
2.5	Auswertung der Meßdaten	15
2.6	Beschreibung der Ca^{2+} -Blockierung durch ein Barrierenmodell	16
3	Ergebnisse	19
3.1	Ca^{2+} -Blockierung der α -Untereinheiten	19
3.1.1	Vergleichende Untersuchungen zur Ca^{2+} -Blockierung der α -Untereinheiten von cng-Kanälen	19
3.1.2	Beschreibung der Blockierung durch ein kinetisches Modell	27
3.1.3	Zusammenfassung	31
3.2	Molekulare Ursachen der Wechselwirkung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ mit cng-Kanälen	32

3.2.1	Aminosäure-Austausche zwischen brcngc α und dmcngc α	33
3.2.2	Chimären zwischen brcngc α und bocngc α	34
3.2.3	Chimären und Punktmutanten zwischen brcngc α und bccngc α	36
3.2.4	Zusammenfassung	40
3.3	Mechanismus der Modulation der Ca ²⁺ -Blockierung	41
3.3.1	Einfluß von Protonen auf die Blockierung der Kanäle durch [Ca ²⁺] _a	42
3.3.2	Einfluß von Protonen in Abwesenheit von Ca ²⁺	43
3.3.3	Einfluß der Koordination auf die Ca ²⁺ -Affinität	45
3.3.4	Zusammenfassung	48
3.4.	Modulation der Blockierung durch andere Faktoren	48
3.4.1	Einfluß der β -Untereinheit auf die Ca ²⁺ -Blockierung von brcngc α und bccngc α	48
3.4.2	Einfluß der Kanaldichte auf die Blockierung durch [Ca ²⁺] _a	51
3.5	Überlegungen zur Mehrfachbesetzung der cng-Kanalpore mit Ca ²⁺ -Ionen	53
4	Diskussion	62
4.1	Ca ²⁺ -Blockierung verschiedener cng-Kanäle	62
4.2	Molekulare Ursachen	64
4.3	Sind cng-Kanäle und Ca ²⁺ -Kanäle evolutionär verwandt ?	66
4.4	Einfluß der β -Untereinheiten auf die Ca ²⁺ -Blockierung	68
4.5	Modulation der Funktion von cng-Kanälen auf zellulärem Niveau: Die Kanaldichte verändert die Ca ²⁺ -Wechselwirkung	68
4.6	Physiologische Bedeutung	69
4.6.1	cng-Kanäle in der Olfaktion: Liefern sie nur ein Ca ²⁺ -Triggersignal?	69
4.6.2	Sehstäbchen und -zapfen unterscheiden sich in ihrer Ca ²⁺ -Homöostase	70
4.6.3	cng-Kanäle in anderen Zellen und Geweben	70
5	Zusammenfassung	72
6	Literatur	74

Anhang A.1: Sequenzvergleich von α -Untereinheiten verschiedener cng-Kanäle	85
Anhang A.2: Chimären zwischen brcngc α und bocngc α	86
Anhang A.3: Chimären zwischen brcngc α und bcngc α	87

I Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropansäure
BS	Bindestelle
c	Konzentration
$[Ca^{2+}]_a$	Ca^{2+} -Konzentration extrazellulär bzw. außen
$[Ca^{2+}]_i$	Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär bzw. innen
Ca^{2+} -CaM	Ca^{2+} -Calmodulin
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
cng	Zyklisch Nukleotid-gesteuert (<i>cyclic nucleotide-gated</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl Ether) N,N,N',N'-tetraessigsäure
F	Faradaykonstante, $96485 \text{ C} \cdot \text{Mol}^{-1}$
GARP	Glutamat-reiches Protein (<i>Glutamic acid rich protein</i>)
g_{Ca}	Ca^{2+} -Leitfähigkeit
g_K	K^+ -Leitfähigkeit
HEK 293-Zellen	Zellen der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293 (<i>human embryonic kidney</i>)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
I	Strom
I_{Ca}	von Ca^{2+} -Ionen getragener Strom
I_{max}	maximaler Strom
I_{min}	minimaler Strom
I_{pip}	Pipettenstrom
k_i	Geschwindigkeitskonstante
K_i	Bindekonstante
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
n	Hillkoeffizient
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NTA	N,N-bis(Carboxymethyl)glyzin (<i>Nitrilotriacetic acid</i>)
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OSN	Olfaktorische sensorische Neurone
p	Wahrscheinlichkeit
PDE	Phosphodiesterase
P_f	fraktionaler Ca^{2+} -Strom (Anteil des Ca^{2+} -Stroms am Gesamtstrom)
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
R	allgemeine Gaskonstante, $8.315 \text{ J} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, bzw. auch Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
T	absolute Temperatur in Kelvin, $0 \text{ K} = -273.15 \text{ }^\circ\text{C}$
TAPS	N-tris(Hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
V	Spannung
	V_c Spannung, bei der K_i eines Kanals minimal ist (<i>critical voltage</i>)
	V_m Membranspannung
	V_{rev} Umkehrpotential
z	Valenz

II Kode der Aminosäuren

<u>Name</u>	<u>1-Buchstaben-Kode</u>	<u>3-Buchstaben-Kode</u>
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glyzin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

1 Einleitung

1.1 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle: Vorkommen und Aufbau

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte (cng) Ionenkanäle bilden eine Familie von Kationenkanälen (Kaupp, 1991; Eismann *et al.*, 1993; Yau, 1994; Finn *et al.*, 1996). Ihre Aminosäuresequenzen zeigen sowohl strukturelle Merkmale von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Jan & Jan, 1990; Guy *et al.*, 1991; Goulding *et al.*, 1992; Bönigk *et al.*, 1993) als auch von zyklisch Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen (Kumar & Weber, 1992). Funktionell gehören cng-Kanäle zur Klasse der ligandengesteuerten Ionenkanäle, da ihr Öffnungszustand direkt und kooperativ durch 3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bzw. 3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert wird (Zufall *et al.*, 1994; Kaupp, 1995). Am besten untersucht und charakterisiert sind cng-Kanäle in sensorischen Zellen von Vertebraten (Fesenko *et al.*, 1985; Haynes & Yau, 1985; Nakamura & Gold, 1987). Inzwischen wurden cng-Kanäle auch in anderen, nicht-sensorischen Zellen nachgewiesen (Nawy & Jahr, 1990; Ahmad *et al.*, 1992; Biel *et al.*, 1993; Ahmad *et al.*, 1994; Biel *et al.*, 1994; Weyand *et al.*, 1994). Als erster cng-Kanal in Invertebraten wurde ein cGMP-gesteuerter Kanal in der Taufliege *Drosophila melanogaster* gefunden (Baumann *et al.*, 1994).

In den Sehstäbchen und -zapfen der Vertebratennetzhaut stellen cng-Kanäle das letzte Glied in der Enzymkaskade der Phototransduktion dar. Im Dunkelzustand werden cng-Kanäle in der Plasmamembran durch die erhöhte Konzentration des intrazellulären Transmitters cGMP offengehalten und leiten Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Photorezeptorzellen. Die lichtinduzierte Enzymkaskade beginnt mit der Absorption eines Photons durch Rhodopsin und endet mit der Hydrolyse von cGMP (Yau & Baylor, 1989; Stryer, 1991; Kaupp & Koch, 1992; Yau, 1994). Durch die Abnahme der intrazellulären cGMP-Konzentration dissoziieren cGMP-Moleküle von den Bindestellen der Kanäle, so daß diese schließen. Die resultierende kurzzeitige Hyperpolarisation der Membran bewirkt am synaptischen Endglied der Sehzelle eine verminderte Freisetzung des Transmitters Glutamat (Massey, 1990).

In den sensorischen Neuronen des olfaktorischen Epithels (OSN) spielen cng-Kanäle eine Rolle bei der Duftstoffrezeption. Nach Aktivierung spezifischer Duftstoffrezeptoren erhöht sich die intrazelluläre cAMP-Konzentration und cng-Kanäle werden geöffnet (Reed, 1992;

Breer *et al.*, 1994; Zufall *et al.*, 1994). Die dabei einfließenden Ca^{2+} -Ionen aktivieren Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle und die Zelle depolarisiert (Kleene, 1993; Kurahashi & Yau, 1993; Lowe & Gold, 1993).

Auch im Schwanz von Rinderspermien konnte ein cng-Kanal nachgewiesen werden (Weyand *et al.*, 1994). Es wird spekuliert, ob dort eine ähnliche Signaltransduktionskaskade wie in Riechzellen existiert und z.B. das Schwimmverhalten steuert (Weyand *et al.*, 1994).

Der cng-Kanal aus *Drosophila* konnte noch nicht genau lokalisiert werden. Bisher konnte nur gezeigt werden, daß er sowohl in den Augen als auch in den Antennen exprimiert wird (Baumann *et al.*, 1994). Die genaue Funktion des Kanals ist ebenfalls noch unklar. Möglicherweise vermittelt der cng-Kanal bei *Drosophila* sowohl die Phototransduktion als auch die Duftstoffrezeption (Baumann *et al.*, 1994).

Die cng-Kanäle bilden heterooligomere Komplexe, die, soweit bekannt, aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α und β , bestehen. Die α -Untereinheiten aus Sebstäbchen (Cook *et al.*, 1987; Kaupp *et al.*, 1989; Dhallan *et al.*, 1992; Pittler *et al.*, 1992; Bönigk *et al.*, 1993), Sehzapfen (Bönigk *et al.*, 1993; Weyand *et al.*, 1994) und aus OSN (Dhallan *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992) verschiedener Spezies sind inzwischen aufgereinigt oder kloniert worden. α -Untereinheiten bilden in heterologen Expressionssystemen funktionelle oligomere Ionenkanäle, die in vielen Eigenschaften den nativen Kanälen ähneln. In manchen Eigenschaften unterscheiden sie sich jedoch. Bei den nativen cng-Kanälen aus Sebstäbchen sind beispielsweise (a) die Pharmakologie, (b) das Öffnungsverhalten und (c) die Ca^{2+} -Calmodulin (Ca^{2+} -CaM) abhängige Modulation der Aktivierung anders als bei den heterolog exprimierten α -Untereinheiten: (a) Der native Kanal wird durch mikromolare Konzentration des Ca^{2+} -Kanalblockers l-cis-Diltiazem blockiert (Koch & Kaupp, 1985; Stern *et al.*, 1986; Quandt *et al.*, 1991), die allein exprimierte α -Untereinheit hingegen erst bei 10-20fach höheren Konzentrationen (Kaupp *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1993). (b) Das Schaltverhalten („flickering“) des nativen Kanals unterscheidet sich deutlich von dem der homooligomeren α -Untereinheit (Chen *et al.*, 1993; Körschen *et al.*, 1995). (c) Während Ca^{2+} -CaM die Ligandensensitivität des nativen Kanals verringert (Hsu & Molday, 1993; Hsu & Molday, 1994; Gordon *et al.*, 1995; Körschen *et al.*, 1995; Nakatani *et al.*, 1995), ist diese Modulation im α -homooligomeren Kanal nicht zu beobachten (Chen *et al.*, 1994; Körschen *et al.*, 1995).

Die nativen cng-Kanäle in OSN unterscheiden sich von den homooligomeren Kanälen insbesondere in ihrer Empfindlichkeit für cAMP. So ist der native cng-Kanal etwa 30fach empfindlicher für cAMP als die heterolog exprimierte α -Untereinheit (Bradley *et al.*, 1994; Liman & Buck, 1994).

In Sebstäbchen (Chen *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Körschen *et al.*, 1995), in OSN (Bradley *et al.*, 1994; Liman & Buck, 1994) und in Hodengewebe (Biel *et al.*, 1996) wurden mittlerweile weitere Untereinheiten (α_2 , β) nachgewiesen. Diese können, wenn sie alleine heterolog exprimiert werden, keine funktionellen Kanäle bilden. Doch durch Koexpression mit den entsprechenden α -Untereinheiten entstehen Kanäle mit Eigenschaften, die denen der nativen Kanäle weitgehend gleichen (Chen *et al.*, 1993; Bradley *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994; Liman & Buck, 1994; Körschen *et al.*, 1995).

1.2 Strukturelle Eigenschaften der α - und β -Untereinheiten

Die transmembranale Topologie der α -Untereinheiten ist weitgehend aufgeklärt (Abb.1.1.1). Das N- und das C-terminale Ende des Polypeptids liegt intrazellulär (Cook *et al.*, 1989; Molday *et al.*, 1991). Jede Untereinheit besitzt 6 transmembranale Segmente, die in Anlehnung an die Membrantopologie der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle mit S_1 bis S_6 bezeichnet werden (Henn *et al.*, 1995). Die Bindestelle für zyklische Nukleotide wurde durch Sequenzvergleiche mit cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Takio *et al.*, 1984; Weber *et al.*, 1987) in der C-terminalen Region lokalisiert (Kaupp *et al.*, 1989), was später durch eine Mutagenesestudie experimentell bestätigt wurde (Altenhofen *et al.*, 1991). Im transmembranalen Segment S_4 befindet sich ein Sequenzmotiv, das dem Spannungsfühler-Motiv der spannungsabhängigen Kanäle, besonders dem der K^+ -Kanäle aus der *Shaker*-Familie ähnelt (Jan & Jan, 1990). Die Funktion dieses Motivs in cng-Kanälen ist jedoch noch unklar. Eine weitere Domäne, die der Porenregion der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle ähnlich ist, liegt zwischen S_5 und S_6 (Goulding *et al.*, 1992; Heginbotham *et al.*, 1992; Bönigk *et al.*, 1993). Diese Domäne ist in cng-Kanälen an der Ausbildung der Pore beteiligt (Root & MacKinnon, 1993; Eismann *et al.*, 1994).

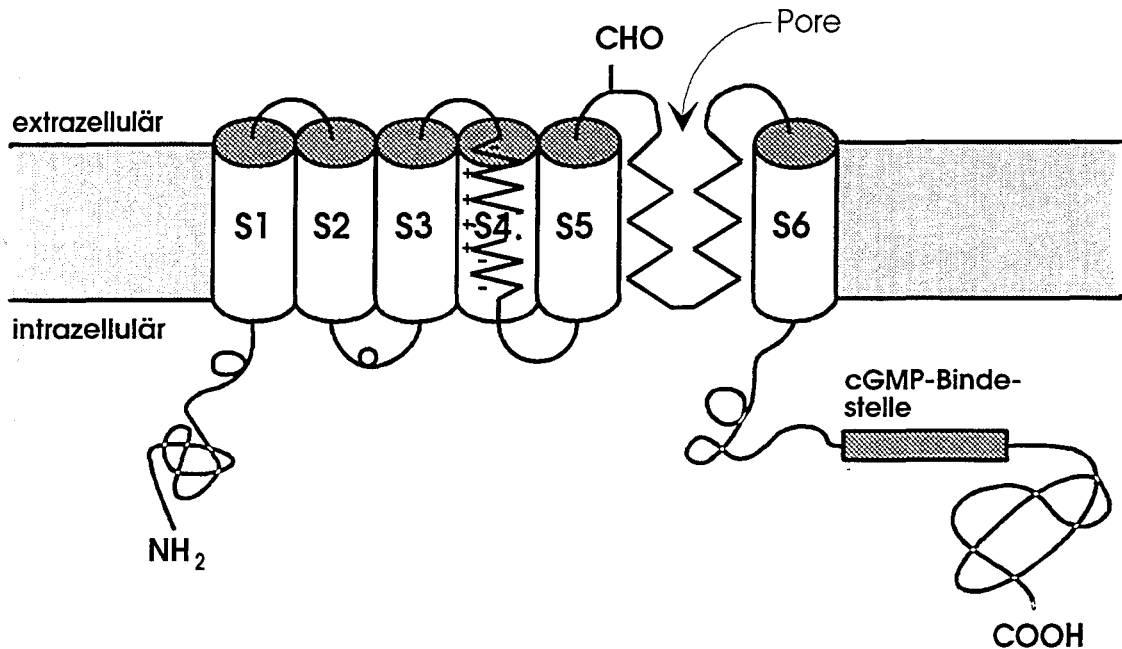


Abb.1.1.1: Transmembranale Topologie der α -Untereinheit von cng-Kanälen (nach Henn *et al.*, 1995). S₁-S₆: transmembranale Domänen. CHO: Die α -Untereinheit des cng-Kanals aus Rindersechstäbchen ist im N-terminalen Porenbereich glykosyliert (Wohlfart *et al.*, 1989). In der entsprechenden Region liegen auch in den anderen bekannten α -Untereinheiten Konsensus-Glykosylierungsstellen vor.

Die bisher klonierten α -Untereinheiten aus den Sechstäbchen, Zapfen, OSN (die jeweils auch in anderen Zellen exprimiert werden) und aus *Drosophila* sind hinsichtlich der beschriebenen Struktur sehr ähnlich. Vor allem im Bereich der transmembranalen Domänen und der cGMP-Bindestelle beträgt die Sequenzhomologie etwa 90%. Nur in den C-terminalen und vor allem N-terminalen Bereichen unterscheiden sich die Proteine in zum Teil charakteristischer Weise. (Die „Sechstäbchen“-Kanäle zeichnen sich z.B. durch eine besonders lange, geladene Domäne im N-Terminus aus, siehe Anhang A.1).

Die β -Untereinheit aus Rinderspermien ist zu den α -Untereinheiten zu ca. 70% homolog und weist alle für die α -Untereinheiten typischen Sequenzmotive auf: die transmembranalen Segmente S₁-S₆, die cGMP-Bindestelle, das Spannungsfühlermotiv S₄ und die Porenbildende Region. Die β -Untereinheit aus Sechstäbchen dagegen besitzt eine ungewöhnliche, zweiteilige Struktur (Körschen *et al.*, 1995). Der N-terminale Teil (die ersten 571 Aminosäuren) ist im wesentlichen identisch mit einem Glutamat-reichen Protein (GARP) aus der Rindernetzhaut, dessen Funktion unbekannt ist (Sugimoto *et al.*, 1991). Der C-terminale Teil entspricht der β -Untereinheit aus Spermien.

Liganden-gesteuerte Kanäle sind meist durch eine pentamere Struktur charakterisiert (Cooper *et al.*, 1991; Devillers-Thiéry *et al.*, 1993). Für die homooligomeren Kanäle aus α -Untereinheiten gibt es aber Hinweise für eine tetramere Anordnung der Untereinheiten (Gordon & Zagotta, 1995; Liu *et al.*, 1996), wie sie auch für die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle postuliert wird (MacKinnon, 1991; Liman *et al.*, 1992). Ob die nativen Kanäle aus α - und β -Untereinheiten ebenfalls eine tetramere Struktur annehmen, ist noch nicht bekannt.

1.3 Die Bedeutung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit von cng-Kanälen

Eine wichtige physiologische Eigenschaft der cng-Kanäle ist ihre hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen, da Ca^{2+} bei der Erregung und Adaptation in Photorezeptoren, OSN und vermutlich auch in Spermien eine entscheidende Rolle spielt. Die Aktivität vieler Schlüsselenzyme der Signaltransduktionskaskaden wird durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ reguliert: Im Sebstäbchen stimuliert die lichtinduzierte Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$ die Neusynthese von cGMP durch die Guanylylzyklase (Koch & Stryer, 1988), verkürzt die Lebensdauer der aktiven Phosphodiesterase (PDE) (Kawamura & Murakami, 1991; Kawamura, 1993) und reduziert die Menge des enzymatisch aktiven Rhodopsins (Lagnado & Baylor, 1994). Die Phototransduktion im Sehzapfen gleicht im wesentlichen der im Stäbchen. Die Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, sind Isoformen der entsprechenden Proteine in Sebstäbchen. Trotzdem sind Sehzapfen etwa 30 - 100fach weniger lichtempfindlich und der Zeitverlauf der Lichtantwort ist in Sehzapfen schneller als in Sebstäbchen. Die Ursachen für die Unterschiede in den Lichtantworten sind noch nicht bekannt und möglicherweise nur zu einem geringen Anteil durch unterschiedliche katalytische Aktivitäten der Schlüsselenzyme zu erklären (Pugh & Lamb, 1993; Miller & Korenbrot, 1994; Miller *et al.*, 1994). Vielleicht sind nur Kinetik und Amplitude der Ca^{2+} -Änderungen und die unterschiedliche Ca^{2+} -Abhängigkeit der Enzymaktivitäten für die verschiedenen Lichtantworten in den beiden Photorezeptortypen verantwortlich (Miller & Korenbrot, 1994, aber beachte auch Nakatani & Yau, 1989). Der Ca^{2+} -Anteil am Dunkelstrom ist bei Zapfen etwa doppelt so hoch wie bei Sebstäbchen, so daß im Dunkeln wesentlich mehr Ca^{2+} in die Zapfen-Außensegmente gelangt. Die lichtinduzierte Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ verläuft bei Zapfen schneller als bei

Stäbchen. Es gibt Hinweise darauf, daß die schnellere Lichtreaktion der Zapfen auf der Dynamik der $[Ca^{2+}]_i$ beruht (Korenbrodt, 1995).

Auch in OSN werden Enzyme der Signaltransduktionskaskade von $[Ca^{2+}]_i$ reguliert. OSN besitzen eine Ca^{2+} -CaM-abhängige PDE (Borisy *et al.*, 1992), eine Ca^{2+} -abhängige Phospholipase C (Lo *et al.*, 1993) und eine Ca^{2+} -abhängige Adenylylzyklase (Anholt & Rivers, 1990; Choi *et al.*, 1992; Frings, 1993). Insbesondere aktiviert Ca^{2+} die in der Zilienmembran der OSN gelegenen Cl^- -Kanäle, die einen großen Anteil des Rezeptorstromes tragen (Kleene, 1993; Kurahashi & Yau, 1993; Lowe & Gold, 1993). Die Modulation des cng-Kanals aus OSN durch Ca^{2+} -CaM ist viel ausgeprägter (Chen & Yau, 1994; Liu *et al.*, 1994) als die des Kanals aus Sebstäbchen (Hsu & Molday, 1993; Hsu & Molday, 1994; Gordon *et al.*, 1995; Körschen *et al.*, 1995; Nakatani *et al.*, 1995). Die genaue Bedeutung von Ca^{2+} für die Kinetik und die Empfindlichkeit der Riechantwort ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zusätzlich zu den Effekten von Ca^{2+} auf die Enzyme der Signalkaskade und den indirekten Effekten auf die cng-Kanäle, wechselwirken Ca^{2+} -Ionen auch direkt mit dem Kanalprotein. Einerseits blockieren vor allem extrazelluläre Ca^{2+} - (und auch Mg^{2+} -) Ionen den Strom monovalenter Kationen durch den Kanal, andererseits können sie selber in Abhängigkeit von der Konzentration und des Membranpotentials mehr oder weniger stark permeieren.

Sowohl in den Außensegmenten der Photorezeptoren als auch in der Zilienmembran von OSN sind cng-Kanäle vermutlich die einzige Quelle für einen Ca^{2+} -Einstrom von außen. Wenn man bedenkt, daß die Ca^{2+} -Signale und ihre Bedeutung für Erregung und Adaptation in den unterschiedlichen Zellen sehr verschieden sind, könnte es sein, daß die cng-Kanäle auch unterschiedlich mit Ca^{2+} wechselwirken. Zumindest für die Photorezeptorkanäle gibt es dafür einige Hinweise (Nakatani & Yau, 1988; Perry & McNaughton, 1991; Miller & Korenbrot, 1994; Miller *et al.*, 1994).

Die Untersuchung dieser Fragestellung ist das Thema der hier vorgelegten Arbeit. Es wird zunächst die Wechselwirkung von extrazellulärem Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_a$) mit verschiedenen α -Untereinheiten von cng-Kanälen elektrophysiologisch untersucht. Durch zielgerichtete Mutagenese sollen die für diese Wechselwirkung wichtigen Proteindomänen oder Aminosäurereste identifiziert werden. Außerdem wird der Einfluß der β -Untereinheit auf die Ca^{2+} -Empfindlichkeit heterooligomerer Kanäle untersucht. Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der molekularen Ursachen für Ca^{2+} -Permeabilität in cng-Kanälen.

2 Material und Methoden

2.1 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Methode erlaubt, die extrem kleinen Ströme von nur wenigen Picoampère zu messen, die durch einzelne Ionenkanäle fließen (Hamill *et al.*, 1981). Das Grundprinzip dieser Methode ist einfach (Abb.2.1.1):

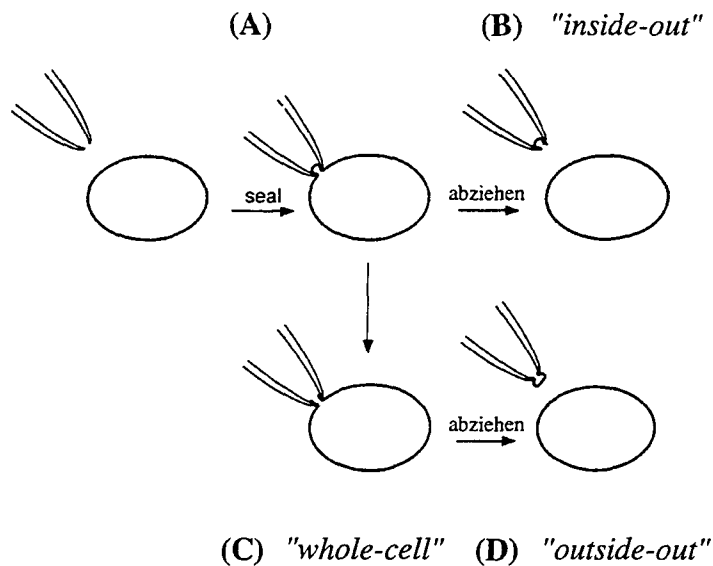


Abb.2.1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen (Beschreibung siehe Text).

Indem man die Spitze einer äußerst dünnen, speziell präparierten Glaspipette dicht auf die Zellmembran aufsetzt, isoliert man das eingegrenzte Membranareal und die darin befindlichen Ionenkanäle elektrisch von der übrigen Membran (A). Der mechanische Kontakt zwischen Membran und Glaspipette, der sich dabei ausbildet, ist außerordentlich fest. Das ermöglicht, dieses Membranareal unter verschiedenen Konfigurationen zu untersuchen:

- „Inside-out“-Konfiguration: Durch Herausreißen des Membranareals erhält man den sogenannten „inside-out“-patch (B). In dieser Konfiguration ist die Innenseite der Membran nach außen gerichtet. Die chemische Zusammensetzung der Bad-Lösung kann variiert werden, wodurch die Wirkung verschiedener Stoffe an der Innenseite der Membran getestet werden kann.

- „whole-cell“-Konfiguration: Durch das Anlegen von Unterdruck oder durch einen kurzen Spannungspuls kann man die Zellmembran unterhalb der Elektrodenspitze aufreißen. In dieser „whole-cell“-Konfiguration (C) kann man Substanzen in die lebende Zelle einführen und so die chemische Zusammensetzung des Zytoplasmas künstlich verändern.
- „outside-out“-Konfiguration: Zieht man aus der „whole-cell“-Konfiguration das Membranstück heraus, verschmelzen seine äußeren Ränder. Nun ist die Außenseite der Zellmembran der Bad-Lösung zugekehrt (D).

In die Glaspipette wird ein chlorierter Silberdraht eingeführt, der mit einem hochempfindlichen Vorverstärker (headstage) verbunden ist, der seinerseits Eingang in den Hauptverstärker (LM-EPC7, List-electronic, Darmstadt) hat. Der Hauptverstärker hält über eine Regelschaltung die Membranspannung auf einem gewählten Soll-Wert, indem Leitfähigkeitsänderungen in der Membran durch einen gleichgroßen entgegengesetzten Strom I_{pip} kompensiert werden (Abb.2.1.2).

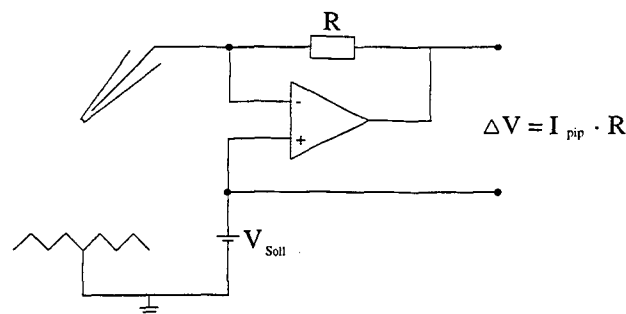


Abb.2.1.2: Vereinfachtes Schaltbild der „Patch-Clamp“-Schaltung (Beschreibung siehe Text).

I_{pip} wird über den hochohmigen Widerstand R gemessen und entspricht dem Membranstrom an der Elektrodenspitze. Das Ausgangssignal des Verstärkers wird über ein 8-Pol Besselfilter (Frequency Devices, Haverhill, USA) zur direkten Kontrolle auf einem Oszilloskop (Typ 400 Gould Hainault, UK) sichtbar gemacht. Parallel wird es über einen A/D-Wandler (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments, Foster City, USA) direkt auf die Festplatte eines Personalcomputers (PC 486) übertragen.

Gemessen wird mit Elektroden aus filamentierten Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) oder mit Elektroden aus sogenanntem weichen (soft) Glas (Blaubrand intramark, Brand, Faust, Aachen). Die Elektrodenwiderstände haben typischerweise 1 - 8 MΩ. Sie

werden mit einem DMZ-Universalpuller (Zeitz, Augsburg) gezogen und je nach Bedarf feuerpoliert. Als Referenzelektrode dient ein chlorierter Silberdraht oder ein Ag-AgCl-Pellet. Die Referenzelektrode wird ständig mit frischer Badlösung umspült. Die Messungen wurden mit Hilfe des CLAMPEX-Modul des Programms pCLAMP (Version 5.5.1, Axon Instruments, Foster City, USA) unter Spannungsklemmbedingungen aufgenommen. Es wurden in der Regel Spannungsrampen (Dauer 2 - 5 s) von +80 mV bis -80 mV am patch appliziert. Jede gespeicherte I_{V_m} -Messung stellte den Mittelwert aus 3 - 8 einzelnen Spannungsrampen dar.

2.2 Expressionssysteme

In dieser Arbeit wurden als Expressionssysteme Oozyten des südafrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) sowie eine Zelllinie von menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen) verwendet.

2.2.1 Vorbereitung der Oozyten

Nach Narkose in 1%-Tricainlösung wurden den Froschweibchen 1 - 2 Ovarlappen entnommen und in modifizierte Barthlösung (Barth & Barth, 1959; Gurdon, 1974) überführt. Die Oozyten wurden durch ein- bis dreistündiges Schütteln in Kollagenase-haltiger Barthlösung vereinzelt und anschließend gründlich gewaschen.

Zur Injektion von *in vitro* transkribierter RNA in die Oozyten wurden Injektionskanülen aus unfilamentierten Glaskapillaren (Außendurchmesser 1.3 mm; Innendurchmesser 0.8 mm; Hilgenberg, Malsfeld) mit einem Vertikalpuller (L/M-3P-A, List Medical, Darmstadt) vorbereitet. Unter dem Mikroskop wurde die Spitze abgebrochen und mit Hilfe einer "Mikroschmiede" (L/M-CP2101, List Medical, Darmstadt) zu einer runden Öffnung mit feinem Fortsatz ausgezogen. Die fertige Spitze hatte einen Öffnungsdurchmesser von 3 - 9 μm und eine Länge von etwa 0.8 mm (ab der Verjüngung des Schaftes).

Die RNA-Lösung (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde mittels Kapillarkräften in ein 10 μl Hämatokritröhrchen überführt und von dort mit Unterdruck in die Spitze der Injektionskanüle gezogen. Mit Hilfe eines Mikroinjektors (Mikroinjektor 5242, Eppendorf,

Hamburg) wurde soviel RNA-Lösung injiziert, daß sich eine Vergrößerung der Oozyten beobachten ließ (ca. 50 nl). Der Überdruck (800 - 1200 hPa) wurde, je nach Öffnungsdurchmesser so gewählt, daß die Injektionsdauer ca. 1 s betrug. Nach der Injektion wurden die Oozyten bei 19°C in antibiotikahaltiger Barthlösung inkubiert. Mit den elektrophysiologischen Untersuchungen wurde nach 2 Tagen begonnen. Die Oozyten wurden zwei bis fünf Minuten in hypertonischer Kaliumaspartatlösung (Methfessel *et al.*, 1986) inkubiert und die Vitellinmembran vorsichtig mit zwei Dumont-Pinzetten entfernt. Die Oozyten wurden anschließend in die Meßkammer überführt und elektrophysiologisch untersucht.

2.3 Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien stammten von Sigma (Deisenhofen) bzw. Fluka (Heidelberg).

2.3.1 Inkubationslösungen für Oozyten

Das modifizierte Barthmedium zur Aufbewahrung der Oozyten bestand aus:

88 mM NaCl
1 mM KCl
2.4 mM NaHCO₃
0.82 mM MgSO₄
0.3 mM Ca(NO₃)₂
0.41 mM CaCl₂
15 mM HEPES (pH 7.4)

Antibiotikazusatz (je 100 ml Barthlösung):

10⁵ U Penicillin
10 mg Streptomycin
0.4 mg Zinazef
10 mg Gentamycinsulfat

Kollagenase-haltige Barthlösung:

1.5 -2.5 mg Kollagenase (Typ IA)/ml Barthlösung

2.3.2 Meßlösungen

Alle in dieser Arbeit gezeigten Messungen wurden in der outside-out-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Da die hier untersuchten cng-Kanäle die Bindestelle für zyklische Nukleotide auf der Innenseite der Membran haben, wurden die Kanäle von der Pipette aus aktiviert.

Die Pipettenlösung enthielt, wenn nicht anders vermerkt:

126 mM KCl
10 mM HEPES
10 mM EGTA
24 mM KOH (pH 7.4)
1 mM cGMP

Die Lösungen für die Blockierungsexperimente mit extrazellulärem Ca^{2+} enthielten:

100 mM KCl
10 mM HEPES
10 mM EGTA
45 - 50 mM KOH

Die Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration, die nötig war, um die gewünschte freie Ca^{2+} -Konzentration zu erhalten, wurde mit einem Computerprogramm von Fabiato (Fabiato, 1988) oder mit dem Programm CHELATOR (Schoenmakers, Nijmegen, Niederlande) mit Hilfe der Assoziationskonstanten nach Martell und Smith (1989) berechnet. Für einige Messungen wurde auch EGTA durch NTA ersetzt. Da in diesem Fall eine geringere Menge an KOH nötig war, um diesen Puffer auf pH 7.4 zu titrieren, wurde KCl zugegeben, damit in allen Lösungen eine Gesamtkonzentration von 150 mM K^+ vorlag. Die nominell Ca^{2+} -freie Lösung entsprach der Pipettenlösung ohne zugesetztes cGMP.

Die Lösungen für die pH-Abhängigkeit der Ca^{2+} -Blockierung enthielten:

a) Bad-Lösung: 145 mM KCl
50 μM CaCl_2
10 mM pH-Puffer (MES für pH 5-6, PIPES für pH 6.5,
HEPES für pH 6.8 - 7.5, TAPS für pH 8 - 8.5, CHES für pH 9)
5 mM KOH

b) Ca^{2+} -freie Badlösung: 126 mM KCl
10 mM EGTA
10 mM pH-Puffer (wie oben)
24 mM KOH

c) Pipettenlösung: 126 mM KCl
10 mM EGTA
10 mM pH-Puffer (wie oben)
24 mM KOH
0.5 mM cGMP

Die Lösung für die Leckstromkontrolle enthielt:

130 mM NMDGCl
5 mM HEPES
5 mM EGTA
20 mM KCl
(pH 7.4, HCl)

2.4 Eichung der Ca^{2+} -Konzentration

Das genaue Einstellen freier Ca^{2+} -Konzentrationen mit Ca^{2+} -Puffern ist nicht immer zuverlässig. Die Hauptgründe hierfür scheinen die ungenauen Angaben bezüglich der Reinheit von Ca^{2+} -Puffersalzen zu sein (Bers, 1982; Bers *et al.*, 1994). Hieraus entstehen Ungenauigkeiten in der freien Ca^{2+} -Konzentration, die Größenordnungen betreffen können (Bers *et al.*, 1994). Fehlerhafte Ca^{2+} -Konzentrationen führen bei der Messung von Ca^{2+} -Abhängigkeiten sicher zu falschen Werten für die Bindeaffinität. Insbesondere bei Betrachtungen über Kooperativität, die in vielen Ca^{2+} -Bindungsproteinen eine große Rolle spielt (Ikura, 1996), muß die freie Ca^{2+} -Konzentration sehr genau bekannt sein, um nicht zu Fehlinterpretationen zu führen.

Die einfachste Möglichkeit, diesem Problem zu entgehen, ist die Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration der angefertigten Lösungen. Es wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet, die Meßlösungen zu eichen:

- Die Messung mit einer Ca^{2+} -sensitiven Mikroelektrode
- Die Messung mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Arsenazo III

2.4.1 Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit einer Ca^{2+} -selektiven Elektrode

Eine Eichkurve für Messungen mit einer Ca^{2+} -Elektrode (Kwikcal, WPI, Berlin) wurde mit Eichlösungen (CALBUF 1, WPI, Berlin) aufgenommen, die nach einer Methode von Tsien & Rink (1980) hergestellt worden waren. Die Lösungen mit unbekannter Ca^{2+} -Konzentration wurden gemessen und die freie Ca^{2+} -Konzentration aus der Eichkurve bestimmt. Abb.2.4.1 zeigt eine typische Eichkurve.

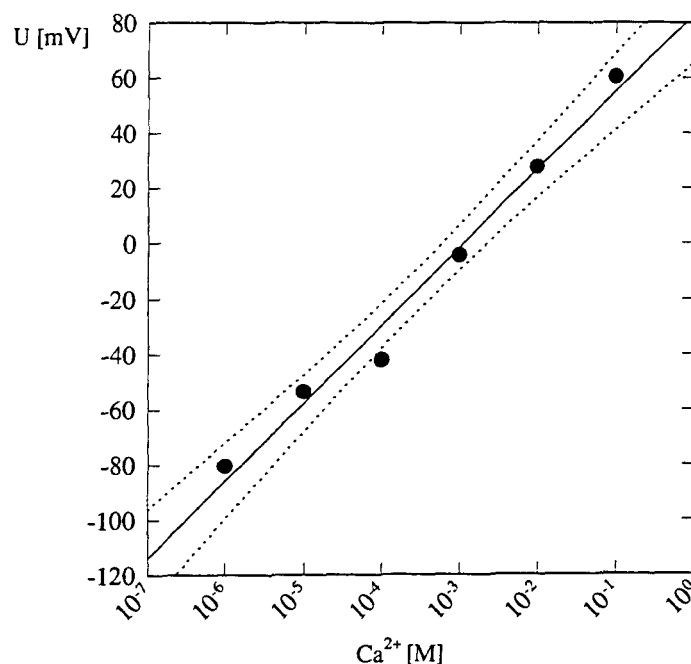


Abb.2.4.1: Eichkurve für die Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit einer Ca^{2+} -Elektrode. Die Meßwerte sind Mittelwerte aus mindestens drei aufeinanderfolgenden Bestimmungen. Die durchgezogene Linie ist eine lineare Regression, die gepunktete Linie zeigt das Konfidenzintervall der Regression.

Für die Güte der Eichung sind exakte Lösungen unabdingbar. Durch nur eine fehlerhafte Konzentrationsangabe, insbesondere im interessanten Meßbereich, kann die Eichung Fehler bei der Auswertung provozieren (siehe Abb.2.4.1, für $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$).

2.4.2 Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit dem Ca^{2+} - Farbstoff Arsenazo III

Eine Alternative ist die Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration mit dem Azo-Farbstoff Arsenazo III. Die Absorptionseigenschaften dieses Farbstoffes ändern sich in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die Eichkurve wurde aufgenommen, indem man steigende Ca^{2+} -Konzentrationen in die Probenlösung pipettiert und gegen die Referenzlösung mißt. Die Lösungen mit unbekannter Ca^{2+} -Konzentration wurden ebenfalls gegen die Referenz gemessen und die freie Ca^{2+} -Konzentration aus der Eichkurve bestimmt.

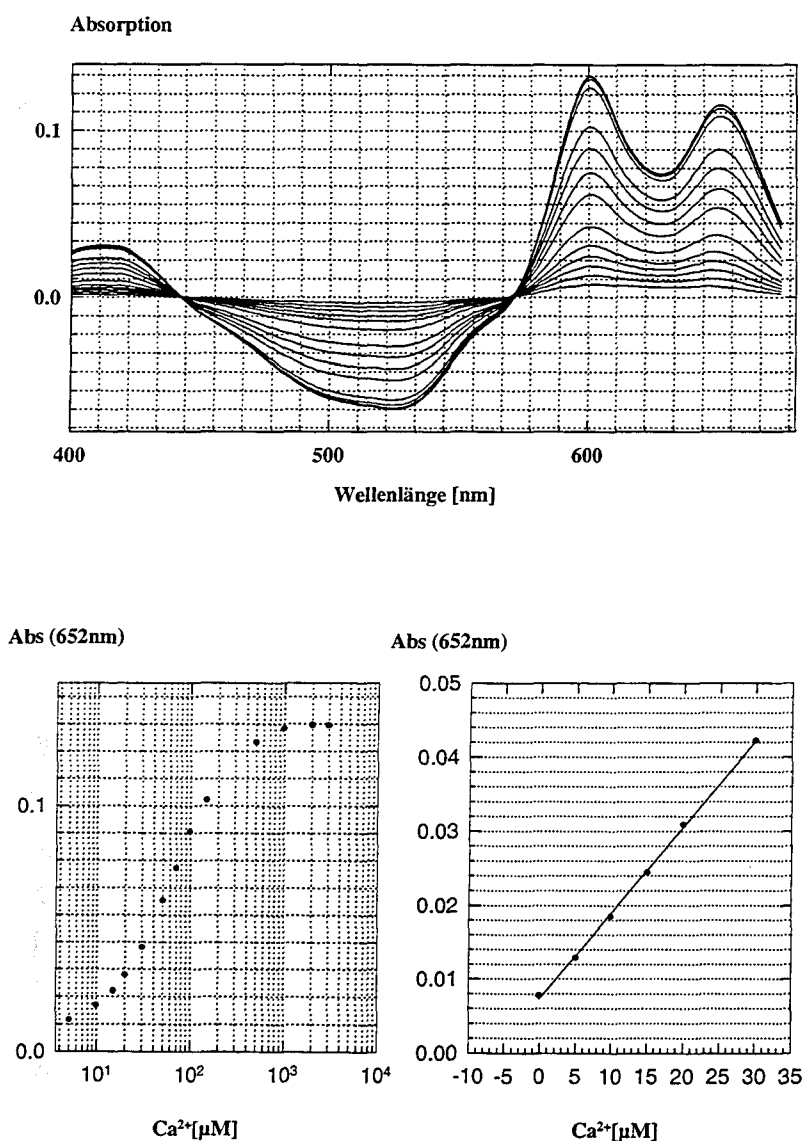


Abb.2.4.2: Eichkurve für die Ca^{2+} -Bestimmung mit Arsenazo III. (oben): Absorptionsspektrum von Arsenazo III für verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen. (unten): Ca^{2+} -Abhängigkeit der Absorption bei 652 nm.

Abb.2.4.2 zeigt eine mit Arsenazo III gemessene Ca^{2+} -Eichkurve. Der Vorteil dieser Methode ist, daß man nicht auf käufliche Eichlösungen angewiesen ist, und daß man die Eichkurve unter den Ionenbedingungen aufnehmen kann, wie sie in der unbekannten Meßlösung vorliegen. Der Nachteil von Arsenazo III ist die starke Abhängigkeit der Ca^{2+} -Bindekonstante von den äußeren Bedingungen. So ist diese Bindekonstante von Arsenazo III sehr stark pH-abhängig, von anderen divalenten Kationen beeinflusst, und abhängig von der pH-Pufferkonzentration (Bauer, 1981).

2.5 Auswertung der Meßdaten

Von den in der outside-out-Konfiguration gemessenen I_{m} -Kurven müssen die Leckströme subtrahiert werden. Die Lösung für die Leckstromkontrolle enthielt 20 mM K^{+} -Ionen. Da NMDG den Kanal nicht permeiert, kann beim Nernstpotential des Kanals für K^{+} -Ionen bei -46 mV der Leckstrom bestimmt werden. Aus diesem Wert wurde der Leckstrom über den ganzen Spannungsbereich berechnet. Eine mögliche Fehlerquelle dieser Abschätzung ist, daß der Leckstrom stark Ca^{2+} -abhängig ist.

Für die Ca^{2+} -Blockierungsmessungen wurde zur Berechnung der Konstanten K_i und des Hillkoeffizienten n ein Programm benutzt, das die Kurven nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus (Levenberg, 1944) an die modifizierte Hillgleichung anpaßt (Altenhofen, 1995):

$$\frac{I}{I_{\text{max}}} = 1 - \frac{c^n}{c^n + K_i^n} \quad (1)$$

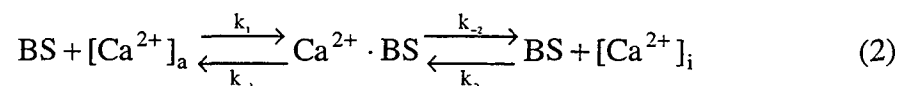
2.6 Beschreibung der Ca^{2+} -Blockierung durch ein Barrierenmodell

Für die Blockierung von Ionenkanälen durch permeierende Ionen wurde von Woodhull (1973) ein sehr einfaches Barrierenmodell formuliert.

Folgende Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um dieses Modell auf die Ca^{2+} -Blockierung von cng-Kanälen anwenden zu können:

- Die Raten für die Assoziation und Dissoziation von Ca^{2+} an der Bindestelle im Porenbereich des Kanals sind wie in der *Eyring-Rate-Theorie* exponentiell abhängig von der Membranspannung V_m .
- Wenn Ca^{2+} an der Bindestelle gebunden ist, können andere Ionen nicht den Kanal permeieren.
- Die Bindung von Ca^{2+} an der Bindestelle wird praktisch nicht durch andere Ionen gestört. Insbesondere können monovalente Kationen nicht kompetitiv binden.
- Alle Kanäle sind geöffnet.
- Der Ca^{2+} -Strom I_{Ca} unter den angegebenen Bedingungen ist vernachlässigbar klein gegenüber dem Strom, der durch monovalente Ionen getragen wird.
- Das System befindet sich im 'steady-state' Gleichgewicht.

Die Ratengleichungen für einen Kanal mit einer Ca^{2+} -Bindestelle (BS) in der Pore sind dann:



k_i sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Bewegung von Ionen in den jeweiligen Richtungen. Hierbei sind k_1 und k_2 sogenannte „Pseudo-Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung“, da sie die jeweilige Außen- und Innenkonzentrationen des Ions berücksichtigen.

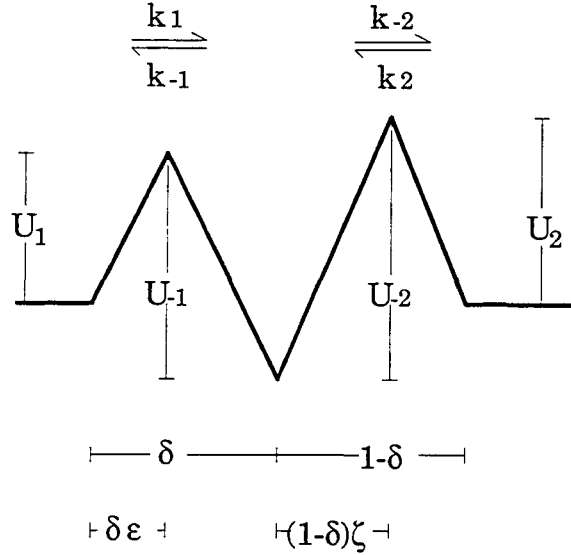


Abb.2.6.1: Schematisches Modell der cng-Kanalpore, repräsentiert durch Energiebarrieren U_i und Lage der Energiemaxima und -minima δ , $\delta\epsilon$, $(1-\delta)\zeta$. Die permeierenden Ionen halten sich bevorzugt im Energieminimum (Bindestelle) auf. Besitzen sie genügend thermische Energie, um die Energiebarrieren zu überwinden, können sie die Pore wieder verlassen.

Die Wahrscheinlichkeit p , daß die Bindestelle (BS) nicht durch Ca^{2+} besetzt ist, ist:

$$p = \frac{I}{I_{\max}} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}} \quad (3)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten k_i sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} k_1 &= [\text{Ca}^{2+}]_a a_1 \exp\left(-\frac{\Delta U_1}{RT} - \frac{z' \delta \epsilon F V_m}{RT}\right) \\ k_{-1} &= a_{-1} \exp\left(-\frac{\Delta U_{-1}}{RT} + \frac{z' \delta (1-\epsilon) F V_m}{RT}\right) \\ k_{-2} &= a_{-2} \exp\left(-\frac{\Delta U_{-2}}{RT} - \frac{z' (1-\delta) \zeta F V_m}{RT}\right) \\ k_2 &= [\text{Ca}^{2+}]_i a_2 \exp\left(-\frac{\Delta U_2}{RT} + \frac{z' (1-\delta)(1-\zeta) F V_m}{RT}\right) \end{aligned} \quad (4.1-4.4)$$

Hierbei ist z' die „effektive“ Valenz des Kanalblockers. R , T und F haben die übliche thermodynamische Bedeutung, die Werte a_i sind Konstanten. U_i und δ , ϵ , ζ bezeichnen die Barrierenhöhen und die jeweiligen Lagen der Energiemaxima und -minima im elektrischen Feld, wie in Abb.2.6.1 eingezeichnet. Für unsere Meßbedingungen ist $k_2 = 0$, da $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$

ist. Die Definition der Geschwindigkeitskonstanten weicht von der Definition in der Originalarbeit von A. Woodhull ab: Dort waren die Werte für ε und ζ fest vorgegeben ($\varepsilon = \zeta = 0.5$). Diese Vorgabe geht von streng symmetrischen Energiebarrieren aus, wobei die Lage der Maxima (siehe Abb.2.6.1) genau 50% auf dem Weg von der Bindestelle nach außen liegen soll. Zunächst wurde auch hier dieser Ansatz gewählt. Es stellte sich heraus, daß mit dieser Annahme keine befriedigende Beschreibung der gemessenen Kurven möglich war. Die Freigabe der Parameter ε und ζ reichten aus, um eine gute Beschreibung zu erhalten. Die Gleichung für die Berechnung der I/I_{\max} -Kurven berechnet sich dann wie folgt: Die unbekannten Werte U_i und a_i werden der Vereinfachung halber kombiniert zu:

$$b_i = a_i \exp\left(\frac{-U_i}{RT}\right) \quad (5)$$

Einsetzen der Gleichungen (5) und (4.1-4.4) in Gleichung (3) ergibt die verwendete Gleichung zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von I/I_{\max} :

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{\frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' \delta(1-\varepsilon)FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-2}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' (1-\delta)\zeta FV_m}{RT}\right)}{[Ca^{2+}]_a \exp\left(-\frac{z' \delta \varepsilon FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' \delta(1-\varepsilon)FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-2}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' (1-\delta)\zeta FV_m}{RT}\right)} \quad (6)$$

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in fünf verschiedene Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die Meßmethode und die Meßanalyse eingeführt, mit denen die Wechselwirkung zwischen cng-Kanälen und Ca^{2+} -Ionen untersucht wird. Anschließend werden verschiedene α -Untereinheiten von cng-Kanälen anhand dieser Meßmethode miteinander verglichen. Ein kinetisches Modell zur mathematischen Beschreibung dieser Ergebnisse wird vorgestellt. Der zweite Teil beschreibt die Ergebnisse eines Mutationsprojektes, das zum Ziel hat, die Aminosäuren bzw. die Proteinbereiche, die für die Modulation der Wechselwirkung von cng-Kanälen und Ca^{2+} verantwortlich sind, zu identifizieren. Anschließend wird im dritten Teil versucht, den molekularen Einfluß dieser Aminosäuren auf die Wechselwirkung von cng-Kanälen und Ca^{2+} -Ionen aufzuklären. Der Einfluß der β -Untereinheit sowie der Einfluß einer hohen Kanaldichte auf die Blockierung ist das Thema des vierten Teiles. Im letzten Teil wird versucht, die Ca^{2+} -Abhängigkeit des sogenannten „funktionalen Ca^{2+} -Stromes“ P_f zu beschreiben, um einen Einblick zu bekommen, ob mehrere Ca^{2+} -Ionen gleichzeitig die cng-Kanalpore besetzen können.

Für die verschiedenen Untereinheiten werden im folgenden Abkürzungen verwendet, die die Herkunft (b: Rind, c: Huhn, o: Kaninchen, h: Mensch, f: Katzenwels) und den Expressionsort (r: Sehstäbchen, c: Sehzapfen, o: OSN, h: Herz, t: Hoden) beinhalten. Außerdem wird angegeben, ob es sich um eine α - oder eine β -Untereinheit handelt. So bezeichnet crngc α beispielsweise die α -Untereinheit aus Sehstäbchen des Huhnes. Die α -Untereinheit aus *Drosophila melanogaster* wird mit dmngc α bezeichnet.

3.1 Ca^{2+} -Blockierung der α -Untereinheiten

3.1.1 Vergleichende Untersuchungen zur Ca^{2+} -Blockierung der α -Untereinheiten von cng-Kanälen

Während Ca^{2+} und auch Mg^{2+} durch cng-Kanäle fließen, blockieren sie den Strom der besser permeierenden monovalenten Kationen (Na^+ , K^+) in einer spannungs- und dosisabhängigen Weise (Root & MacKinnon, 1993; Eismann *et al.*, 1994; Kleene, 1995;

Park & MacKinnon, 1995). Für cng-Kanäle aus Sehstäbchen wurde gezeigt, daß Glutaminsäurereste im Porenbereich eine Kationenbindestelle bilden (Root & MacKinnon, 1993; Eismann *et al.*, 1994). Wenn Ca^{2+} -Ionen an diese Stelle binden, verhindern sie die Permeation monovalenter Kationen (siehe Abb.3.1.1).

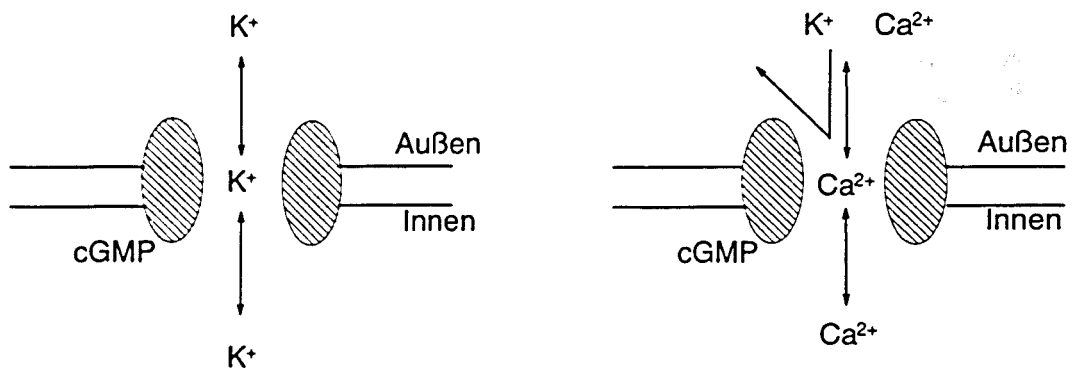


Abb.3.1.1: Schematische Darstellung eines cng-Kanals in der Plasmamembran. Bindet ein Ca^{2+} -Ion im Porenbereich (rechts), verhindert es die Permeation der sonst hochpermeierenden K^+ -Ionen.

Die Glutaminsäurereste im Porenbereich sind in allen bekannten α -Untereinheiten konserviert. Systematische Studien über die Blockierung durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ sind aber bisher nur für den Sehstäbchenkanal des Rindes bekannt, wobei sich die veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich der Ca^{2+} -Blockierungskonstanten deutlich voneinander unterscheiden (Root & MacKinnon, 1993; Eismann *et al.*, 1994). Auch über ein möglicherweise kooperatives Verhalten bei der Blockierung wurde in diesen Arbeiten berichtet, was bedeuten könnte, daß mehrere Ca^{2+} -Ionen an der Blockierung beteiligt sind. Wegen der unterschiedlichen Ergebnisse wurde neben den bisher noch nicht untersuchten α -Untereinheiten aus Sehzapfen und olfaktorischem Epithel auch die aus Rindersehstäbchen neu vermessen.

Die Wirkung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ auf verschiedene α -Untereinheiten wurde an Membranflecken (patches) von *Xenopus* Oozyten untersucht, die die entsprechenden Ionenkanäle exprimierten. Die patches befanden sich in der outside-out-Konfiguration, um die Ca^{2+} -Konzentration an der Außenseite der Membran durch Austausch des Badmediums variieren zu können. Mit 150 mM K^+ und einer nominell Ca^{2+} -freien Lösung ($\leq 10^{-9}$ M, 10 mM EGTA) auf beiden Seiten der Membran beobachtet man fast lineare Strom-Spannungs-(IV_m -)Kurven (Abb.3.1.2, links, hier für brncg α). Erhöht man die Ca^{2+} -Konzentration der extrazellulären Lösung, so beobachtet man die oben beschriebene

Reduktion des Gesamtstromes, wobei die I_{V_m} -Kurven sowohl in hyperpolarisierender als auch in depolarisierender Richtung ein rektifizierendes Verhalten zeigen (siehe Abb.3.1.2, links). Einwärtsströme (bei negativen Spannungen) werden hierbei stärker blockiert als Auswärtsströme (bei positiven Spannungen).

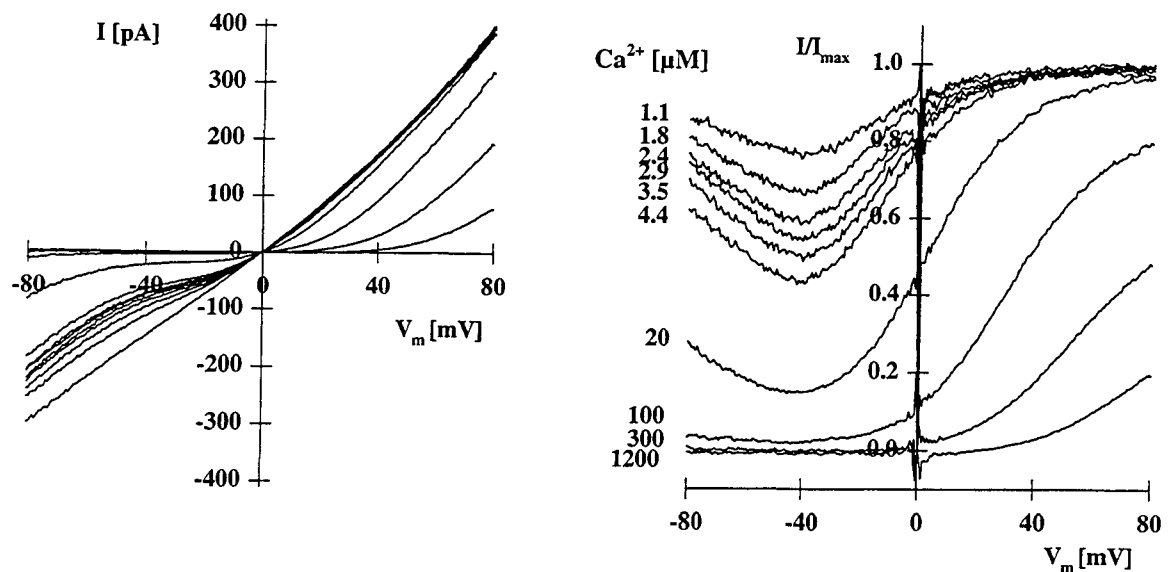


Abb.3.1.2: Makroskopische Strom-Spannungsbeziehung (links) und der nicht blockierte Anteil des Stromes I/I_{max} (rechts) von $brncg\alpha$ bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Pipette enthielt 1 mM cGMP, um die Kanäle zu aktivieren (outside-out Konfiguration). Die Ca^{2+} -Konzentrationen sind an den jeweiligen I/I_{max} -Kurven angegeben.

Die Spannungsabhängigkeit der Blockierung wurde analysiert, indem das Verhältnis I/I_{max} des Stromes I bei einer gegebenen Ca^{2+} -Konzentration zum maximalen, in Ca^{2+} -freier Lösung gemessenen Strom I_{max} berechnet und gegen die Membranspannung V_m aufgetragen wurde (Abb.3.1.2, rechts). I/I_{max} ist der Anteil des Stromes, der nicht durch Ca^{2+} blockiert wird, oder anders ausgedrückt, I/I_{max} ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Pore nicht mit Ca^{2+} -Ionen besetzt ist. Bei einer gegebenen Ca^{2+} -Konzentration ist der Wert für I/I_{max} groß bei positiven Spannungen, nimmt mit kleineren Spannungen stark ab, durchläuft ein Minimum bei negativen Spannungen und steigt dann wieder an (siehe Abb.3.1.2, rechts). Diesen Wiederanstieg von I/I_{max} bei nicht allzu hohen Ca^{2+} -Konzentrationen und bei negativen Spannungen kann man als ein Anzeichen für vermehrte Ca^{2+} -Permeation

interpretieren. Nach dieser Vorstellung erleichtert die Membranspannung die Dissoziation des Ca^{2+} -Ions von der Bindestelle.

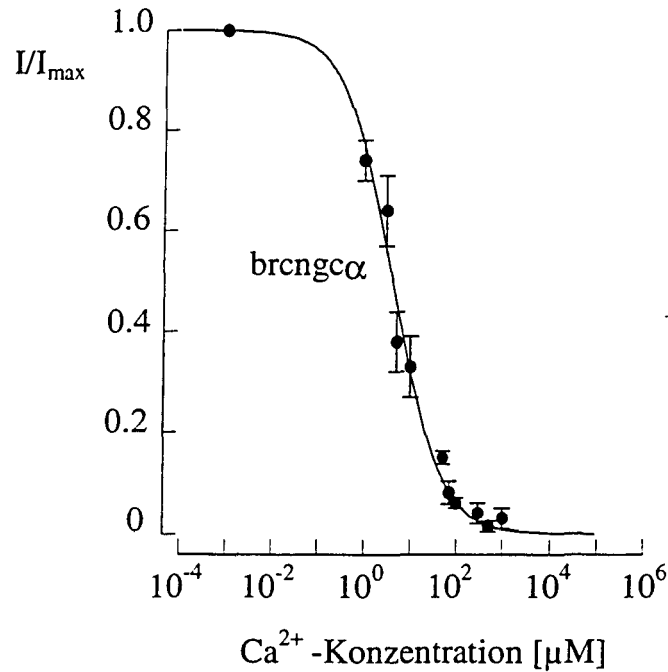


Abb.3.1.3: Dosis-Wirkungskurve von I/I_{max} (bei -60 mV) in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für brngc α . Die durchgezogene Linie wurde nach der modifizierten Hillgleichung $I/I_{\text{max}} = 1 - c^n / (c^n + K_i^n)$ berechnet mit $K_i = 4.05 \mu\text{M}$, $n = 0.9$. Mittelwerte und Standardabweichung aus 9 Versuchen.

Für jede Spannung V_m lassen sich Dosis-Wirkungsabhängigkeiten der Blockierung durch Ca^{2+} aufstellen, indem man I/I_{max} gegen $[\text{Ca}^{2+}]_a$ aufträgt (Abb.3.1.3). Die durchgezogene Linie in Abb.3.1.3 wurde nach der modifizierten Hillgleichung

$$\frac{I}{I_{\text{max}}} = 1 - \frac{c^n}{c^n + K_i^n} \quad (1)$$

berechnet (in diesem Fall mit: $K_i = 4.05 \mu\text{M}$, $n = 0.9$, bei $V_m = -60$ mV). K_i ist die apparente Blockierungskonstante für Ca^{2+} . Sie ist ein Maß für die Blockierungseffizienz. Man könnte K_i auch als eine Affinitätskonstante für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die von Glutaminsäureresten gebildete Stelle in der Pore interpretieren. Der Hillkoeffizient n beschreibt, ob es sich um einen kooperativen Mechanismus handelt.

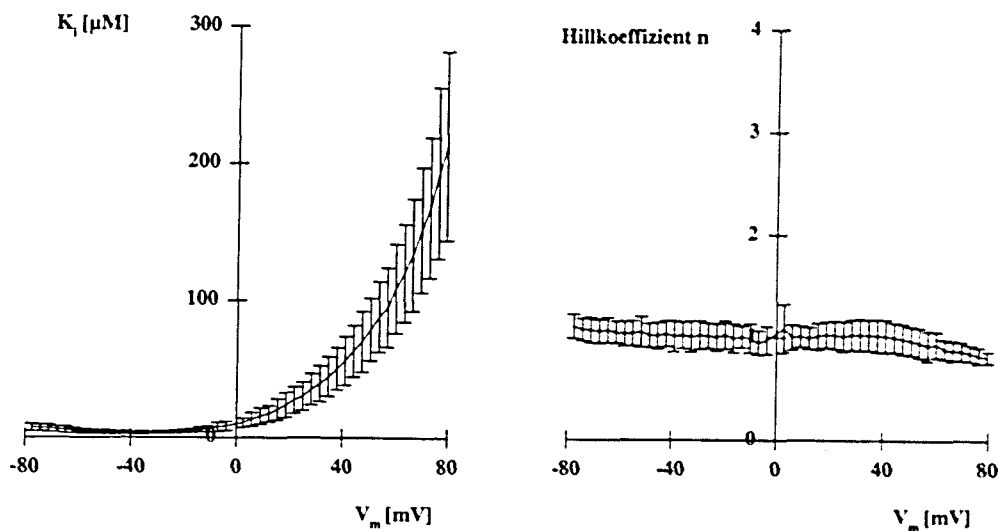


Abb.3.1.4: Spannungsabhängigkeit der Blockierungskonstante K_i (links) und des Hillkoeffizienten n (rechts) für $brcngc\alpha$. Mittelwerte und Standardabweichung aus 9 Versuchen.

Bestimmt man K_i und n für alle gemessenen Spannungen V_m , so erhält man Abb.3.1.4. Der Hillkoeffizient n (Abb.3.1.4, rechts) ist über den gesamten Spannungsbereich nicht wesentlich von eins verschieden. Das deutet an, daß es sich bei der Blockierung von cng -Kanälen durch $[Ca^{2+}]_a$ wahrscheinlich nicht um einen kooperativen Effekt handelt. Die Spannungsabhängigkeit von K_i (Abb.3.1.4, links) verläuft ähnlich wie die Spannungsabhängigkeit von I/I_{max} (siehe Abb.3.1.2, rechts): K_i ist am größten für große positive Spannungen, nimmt dann stark ab bei weniger großen V_m -Werten, durchläuft ein Minimum bei kleinen negativen Spannungen und nimmt für große negative V_m -Werte wieder etwas zu. Die Abnahme der Blockierungseffizienz bei großen negativen Spannungen, die sich in einem Ansteigen von K_i ausdrückt, ist ein qualitatives Maß für die Ca^{2+} -Permeation. Wahrscheinlich wird bei negativen Spannungen die Dissoziation von Ca^{2+} von der Bindestelle und der Durchtritt des Ions zur Innenseite erleichtert.

Abb.3.1.5 zeigt im Vergleich die I/V_m -Kurven für die Ca^{2+} -Blockierung von $brcngc\alpha$, $bccngc\alpha$ und $bocngc\alpha$ mit den zugehörigen Kurven für die Spannungsabhängigkeit von I/I_{max} (Abb.3.1.5, unten).

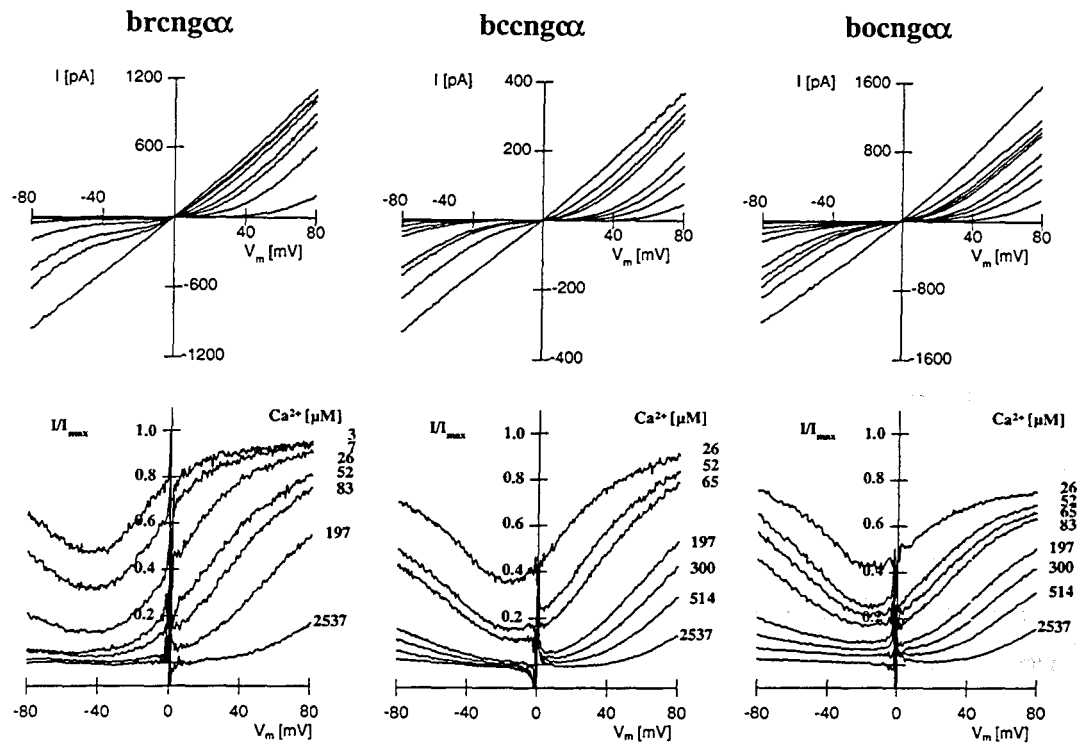


Abb.3.1.5: Vergleich der IV_m -Kurven (oben) und der I/I_{max} - V_m -Kurven (unten) für Ca^{2+} -Blockierungsexperimente von brcngcα (links), bcncgα (Mitte) und bocngcα (rechts). Die cGMP-Konzentration in der Pipette enthielt 1 mM cGMP, um die Kanäle zu aktivieren (outside-out Konfiguration). Die Ca^{2+} -Konzentrationen sind an den I/I_{max} -Kurven angegeben.

Bei gleicher Konzentration blockiert Ca^{2+} den Strom durch brcngcα weitaus effektiver als den Strom durch bcncgα und bocngcα. Außerdem fällt auf, daß die Spannung V_c , bei der der gemessene Strom maximal unterdrückt wird, für die verschiedenen Kanäle sehr unterschiedliche Werte annimmt (s.u.). Abb.3.1.6 (links) zeigt die Ca^{2+} -Abhängigkeit von I/I_{max} (bei -80 mV) für die drei Kanaltypen. Die Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von brcngcα im Vergleich zu bcncgα und bocngcα verdeutlicht die unterschiedliche Blockierungseffizienz bei dieser Spannung.

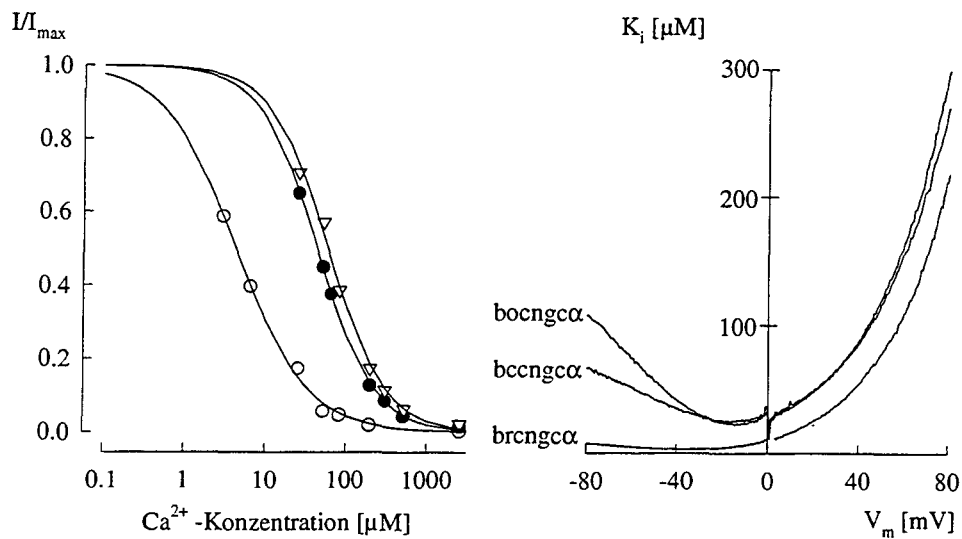


Abb.3.1.6: (links): Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von I/I_{\max} (bei -70 mV) in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration von $\text{brcng}\alpha$ (o) ($K_i = 6.1 \pm 2.2 \mu\text{M}$), $\text{bccng}\alpha$ (•) ($K_i = 59.5 \pm 11 \mu\text{M}$) und $\text{bocng}\alpha$ (∇) ($K_i = 92.3 \pm 26 \mu\text{M}$). (rechts): Vergleich der Spannungsabhängigkeit von K_i für den halbmaximalen Block des cng-Kanalstromes. K_i -Werte sind Mittelwerte aus neun ($\text{brcng}\alpha$), fünf ($\text{bocng}\alpha$) und neun ($\text{bccng}\alpha$) Versuchen.

Abb.3.1.6 (rechts) zeigt die Spannungsabhängigkeit von K_i für $\text{brcng}\alpha$, $\text{bccng}\alpha$ und $\text{bocng}\alpha$. Die Werte für K_i von $\text{brcng}\alpha$ sind über den gesamten Spannungsbereich deutlich geringer als die von $\text{bccng}\alpha$ und $\text{bocng}\alpha$. Die Zunahme von K_i bei großen negativen Spannungen ist bei $\text{bccng}\alpha$ und $\text{bocng}\alpha$ weitaus deutlicher ausgeprägt als bei $\text{brcng}\alpha$. Die Spannungen V_c , bei denen K_i seinen minimalen Wert (maximale Blockierung) erreicht, betragen bei den drei Kanälen:

$$V_c (\text{brcng}\alpha) \cong -38 \pm 5 \text{ mV}$$

$$V_c (\text{bccng}\alpha) \cong -17 \pm 4 \text{ mV}$$

$$V_c (\text{bocng}\alpha) \cong -16 \pm 5 \text{ mV}$$

Die K_i -Werte bei $V_m = -80 \text{ mV}$ betragen:

$$K_{i,-80\text{mV}} (\text{brcng}\alpha) = 7.4 \pm 2.5 \mu\text{M}$$

$$K_{i,-80\text{mV}} (\text{bccng}\alpha) = 66.0 \pm 10.9 \mu\text{M}$$

$$K_{i,-80\text{mV}} (\text{bocng}\alpha) = 109.0 \pm 34.1 \mu\text{M}$$

Sowohl die Werte für V_c als auch für $K_{i,-80mV}$ verdeutlichen die unterschiedliche Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} und der Pore in verschiedenen cng-Kanälen.

Betrachtet man die Abnahme der Blockierungseffizienz bei negativen Spannungen als ein qualitatives Maß für die unterschiedliche Ca^{2+} -Leitfähigkeit g_{Ca} durch cng-Kanäle, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

$$g_{Ca}(\text{brncg}\alpha) < g_{Ca}(\text{bccng}\alpha) < g_{Ca}(\text{bocng}\alpha).$$

Die größte Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen besitzt $\text{bocng}\alpha$, gefolgt von $\text{bccng}\alpha$ und $\text{brncg}\alpha$.

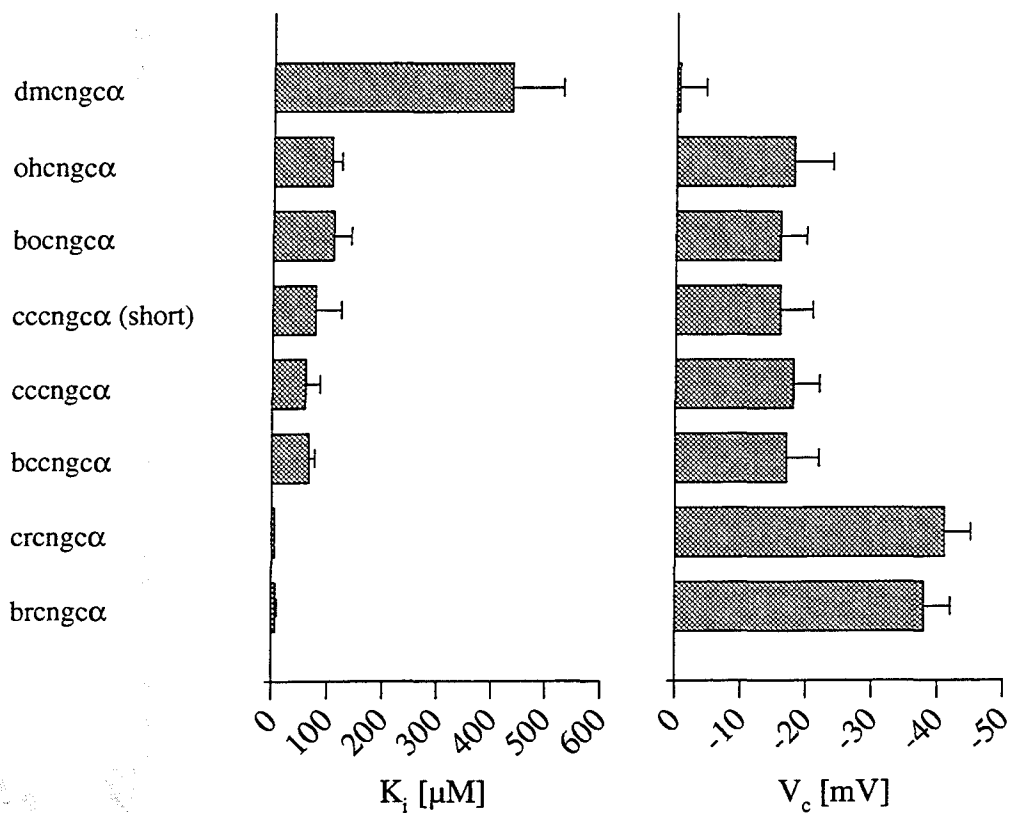


Abb.3.1.7: $K_{i,-80mV}$ -Werte (links) und V_c -Werte (rechts) der untersuchten α -Untereinheiten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. $\text{cccng}\alpha$ (short) ist eine Spleißvariante von $\text{cccng}\alpha$, bei der zwei Exone im N-terminalen Bereich fehlen. $\text{ohcng}\alpha$ wurde aus dem Kaninchenherzen kloniert (Biel *et al.*, 1993), gehört aber aufgrund der Sequenz in die Gruppe der olfaktorischen cng-Kanäle.

Abb.3.1.7 zeigt im Vergleich die Ergebnisse aller hier untersuchten α -Untereinheiten, wobei zur Beschreibung der Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften die Parameter V_c und $K_{i,-80\text{mV}}$ verwendet wurden. Die Sebstbchenkanle (brncg α und crcngc α) werden am stärksten durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ blockiert ($K_{i,-80\text{mV}} < 10 \mu\text{M}$), danach folgen die Kanäle der Sehzapfengruppe (bccngc α , ccngc α und ccngc α (short)) ($K_{i,-80\text{mV}} \approx 50 - 80 \mu\text{M}$), anschließend die Kanäle aus dem olfaktorischen Epithel (bocngc α und ohcngc α) ($K_{i,-80\text{mV}} \approx 100 \mu\text{M}$). Eine Sonderstellung nimmt der *Drosophila*-Kanal ein: Mit $V_c \sim 0 \text{ mV}$ und $K_{i,-80\text{mV}} = 436 \pm 95 \mu\text{M}$ besitzt dieser Kanal die geringste Bindungsaffinität für $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und scheint von allen Kanälen den groten Ca^{2+} -Strom tragen zu können. Abb.3.1.8 zeigt im Vergleich die Spannungsabhängigkeit von K_i für brncg α und dmncg α . Bei dmncg α ist die Blockierungseffizienz durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ bei $V_m = -80 \text{ mV}$ weniger effektiv als bei $V_m = +80 \text{ mV}$.

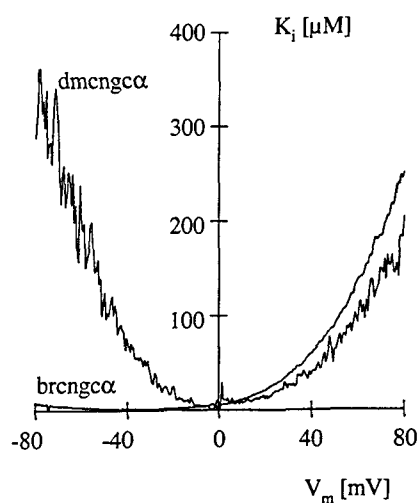


Abb.3.1.8: Vergleich der Spannungsabhängigkeit der Konstante K_i für brncg α und dmncg α .

3.1.2 Beschreibung der Blockierung durch ein kinetisches Modell

Ratentheoriemodelle werden oft verwendet, um Ionenpermeation durch Ionenkanäle zu beschreiben (Hodgkin & Keynes, 1955; Läuger, 1973; Hille, 1979; Übersicht: Hille, 1992). Für die Blockierungsexperimente wurde ein Modell mit zwei Energiebarrieren und einem Energieminimum gerechnet (nach Woodhull, 1973), (siehe Abb.3.1.9).

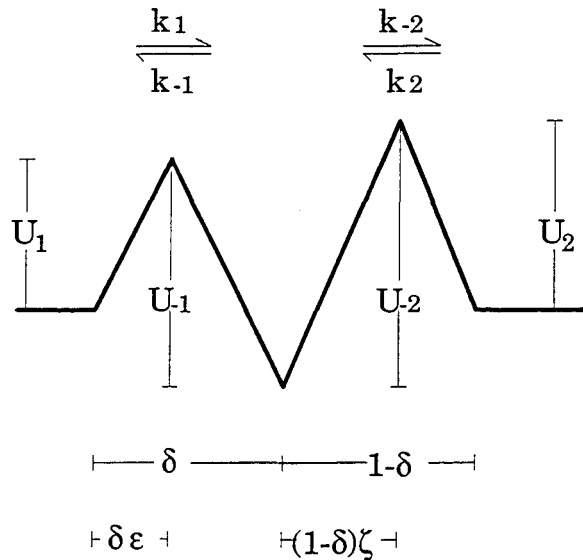


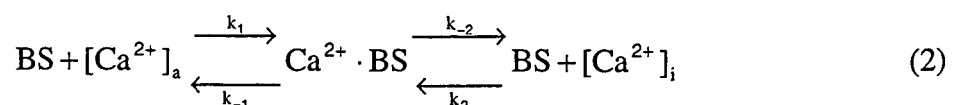
Abb.3.1.9: Schematisches Modell der cng-Kanalpore, repräsentiert durch Energiebarrieren U_i und Lage der Energiemaxima und -minima δ , $\delta \epsilon$, $(1-\delta) \zeta$. Die permeierenden Ionen halten sich bevorzugt im Energieminimum (Bindestelle) auf. Besitzen sie genügend thermische Energie, um die Energiebarrieren zu überwinden, können sie die Pore wieder verlassen.

Ca^{2+} -Ionen besitzen eine im Vergleich zu monovalenten Kationen sehr hohe Affinität für die Bindestelle in cng-Kanälen. Die von Ca^{2+} -Ionen getragenen Ströme sind aber im Vergleich zum Strom durch monovalente Ionen sehr klein.

Das erlaubt es, die Ca^{2+} -Blockierung mit einem einfachen Modell zu beschreiben. Es gibt praktisch nur zwei Zustände:

- Der Kanal ist mit Ca^{2+} besetzt; der Strom, der durch monovalente Ionen getragen wurde, ist blockiert.
- Der Kanal ist nicht mit Ca^{2+} besetzt, monovalente Kationen können den Kanal ungestört passieren.

Damit reduziert sich die Beschreibung des Permeationsverhaltens durch den Kanal vollständig auf die Besetzungswahrscheinlichkeit der Bindestelle (BS) mit Ca^{2+} -Ionen. Die Ratengleichungen für dieses Modell sind:



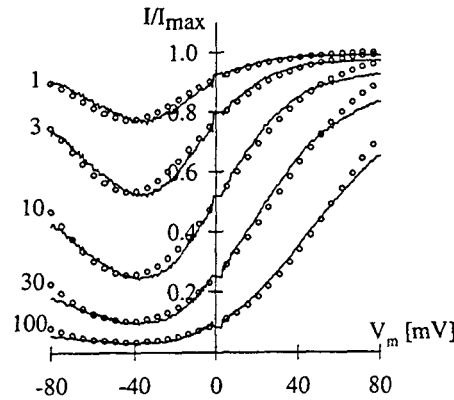
k_i bezeichnet Ratenkonstanten für die Bewegung von Ca^{2+} -Ionen in die jeweilige Richtung, oder anders ausgedrückt, k_i sind die Ratenkonstanten für die Überwindung der Energiebarrieren (Abb.3.1.9). Die Wahrscheinlichkeit p , daß die Bindestelle nicht mit Ca^{2+} -Ionen besetzt ist, ist gegeben durch:

$$p = \frac{I}{I_{\max}} = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}} \quad (3)$$

Die Gleichung für die Beschreibung der Spannungsabhängigkeit von I/I_{\max} lautet dann (für die Definition der Parameter und die Ableitung der Gleichungen siehe Kapitel 2):

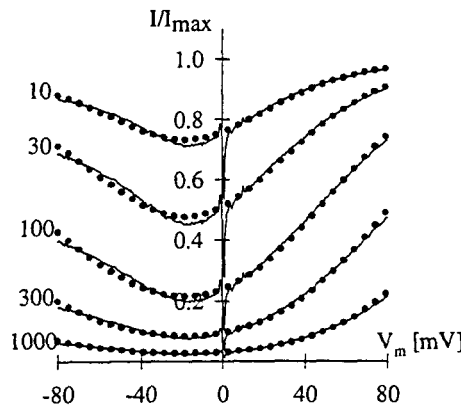
$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{\frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' \delta(1-\varepsilon)FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-2}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' (1-\delta)\zeta FV_m}{RT}\right)}{[\text{Ca}^{2+}]_a \exp\left(-\frac{z' \delta \varepsilon FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-1}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' \delta(1-\varepsilon)FV_m}{RT}\right) + \frac{b_{-2}}{b_1} \exp\left(-\frac{z' (1-\delta)\zeta FV_m}{RT}\right)} \quad (6)$$

Die Anwendung dieser Gleichung auf die Ca^{2+} -Blockierung der verschiedenen cng-Kanäle ergibt für jeden Kanal einen charakteristischen Parametersatz.



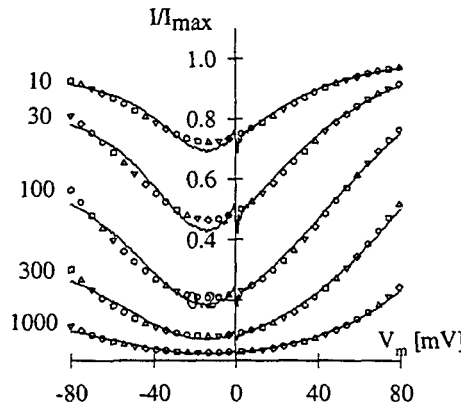
brngcα

$$\begin{aligned} b_{-1}/b_1 &= 1.08 \cdot 10^{-5} \text{M} \\ b_{-2}/b_1 &= 2.60 \cdot 10^{-7} \text{M} \\ \delta &= .46 \\ \varepsilon &= 0.96 \\ \zeta &= 0.97 \\ z' &= 2.26 \end{aligned}$$



bccngcα

$$\begin{aligned} b_{-1}/b_1 &= 2.15 \cdot 10^{-6} \text{M} \\ b_{-2}/b_1 &= 9.72 \cdot 10^{-7} \text{M} \\ \delta &= .40 \\ \varepsilon &= 0.59 \\ \zeta &= 0.79 \\ z' &= 2.10 \end{aligned}$$



bocngcα

$$\begin{aligned} b_{-1}/b_1 &= 2.05 \cdot 10^{-6} \text{M} \\ b_{-2}/b_1 &= 8.31 \cdot 10^{-7} \text{M} \\ \delta &= .42 \\ \varepsilon &= 0.80 \\ \zeta &= 0.86 \\ z' &= 2.14 \end{aligned}$$

Abb.3.1.10: Ergebnisse aus der Anwendung von Gleichung (4) im Vergleich zu den gemittelten I/I_{\max} - V_m -Kurven brngcα (oben), bccngcα (Mitte) und bocngcα (unten). Die Ca^{2+} -Konzentrationen (in μM) stehen links neben den Kurven. Die zur Berechnung verwendeten Parameter sind rechts neben den jeweiligen Graphen angegeben.

Abb.3.1.10 zeigt die gemittelten Meßkurven (durchgezogene Linien) und die nach Gleichung (6) berechneten I/I_{\max} -Kurven (Symbole) für brngcα (Abb.3.1.10, oben), bccngcα (Abb.3.1.10, Mitte), bocngcα (Abb.3.1.10, unten). Rechts neben den Graphen stehen die Parametersätze, mit denen die Kurven berechnet wurden. Betrachtet man das

System bei $V_m = 0$ mV und unter symmetrischen Ionenbedingungen, so ist die Richtung, in die ein von der Bindestelle dissoziierendes Ca^{2+} -Ion wandert, alleine durch das Energieprofil innerhalb der Pore gegeben (siehe Abb.3.1.9). Das Verhältnis b_{-2} / b_{-1} charakterisiert die Richtungspräferenz für verschiedene Kanäle. Je größer das Verhältnis b_{-2} / b_{-1} , desto leichter ist der Durchtritt für Ca^{2+} -Ionen zur Innenseite des Kanals. Man findet:

$$\frac{b_{-2}}{b_{-1}}(\text{brngc}\alpha) = 0.03 < \frac{b_{-2}}{b_{-1}}(\text{bocngc}\alpha) = 0.41 < \frac{b_{-2}}{b_{-1}}(\text{bccngc}\alpha) = 0.45$$

Dies ist ein weiteres qualitatives Maß für die Ca^{2+} -Leitfähigkeit. Hiernach würde $\text{brngc}\alpha$ die geringste Ca^{2+} -Leitfähigkeit besitzen, gefolgt von $\text{bocngc}\alpha$ und $\text{bccngc}\alpha$.

Ein weiteres Ergebnis aus diesem Modell ist der Wert für die sogenannte „effektive Valenz“ z' . Abweichungen der effektiven Valenz z' von der tatsächlichen Ladung z eines Kanalblockers sind bei verschiedenen anderen Kanälen beobachtet worden (Übersicht: Hille, 1992). Sie werden als Hinweis auf eine Mehrfachbesetzung des Kanals verstanden. Die Werte für die effektive Valenz z' für die hier untersuchten Kanäle sind:

$$z'(\text{brngc}\alpha) = 2.26; z'(\text{bccngc}\alpha) = 2.1; z'(\text{bocngc}\alpha) = 2.14$$

Die relativ geringe Abweichung von z' gegenüber $z = 2$ deutet an, daß unter den gegebenen Bedingungen die Bindestelle nur mit einem Ca^{2+} -Ion besetzt ist.

3.1.3 Zusammenfassung

Verschiedene α -Untereinheiten wurden hinsichtlich ihrer Blockierung durch Ca^{2+} -Ionen untersucht. Die Blockierung kann durch ein einfaches Bindungsmodell von Ca^{2+} -Ionen an eine Bindestelle in der Pore beschrieben werden. Die Spannungsabhängigkeit der Blockierung deutet Unterschiede in der Ca^{2+} -Permeabilität bei verschiedenen Kanälen an. Ein kinetisches Modell zur Beschreibung dieser Messungen wurde vorgestellt, das die Spannungsabhängigkeit der I/I_{\max} -Werte befriedigend beschreibt. Dieses Modell unterstützt die Interpretation unterschiedlicher Ca^{2+} -Leitfähigkeiten in verschiedenen cng-Kanälen.

3.2 Molekulare Ursachen der Wechselwirkung von $[Ca^{2+}]_a$ mit cng-Kanälen

Die Porenregion der cng-Kanäle besteht aus etwa 20 Aminosäuren, die zwischen den transmembranalen Segmenten S₅ und S₆ liegen (Goulding *et al.*, 1993). Die Aminosäuren in diesem Bereich können wahrscheinlich direkt mit den durchtretenden Kationen wechselwirken und die Permeationseigenschaften der Kanäle beeinflussen. Abb.3.2.1 zeigt einen Sequenzvergleich der Porenregion von brcngcα, bccngcα, bocngcα und dmcngcα.

		↓	↓											*		↓	↓			
brcngcα	Y	S	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	E	T	P	P	P	V
	349																			368
bccngcα	Y	S	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	E	T	P	P	P	V
	373																			392
bocngcα	Y	C	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	E	T	P	P	P	V
	326																			345
dmcngcα	Y	S	F	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	E	T	P	T	P	E
	301																			320

Abb.3.2.1: Sequenzvergleich des Porenbereiches verschiedener cng-Kanäle. Sequenzunterschiede sind durch Pfeile markiert. Die Glutaminsäure, die die Ca²⁺-Bindestelle formt, ist mit einem Stern markiert. Die vollständige Sequenz der α-Untereinheiten ist im Anhang A.1 aufgeführt.

Die Aminosäuresequenzen der Porenregion für brcngcα und bccngcα sind identisch. bocngcα unterscheidet sich von diesen Sequenzen nur durch einen Serin / Cystein Austausch. Die Unterschiede in der Ca²⁺-Leitfähigkeit zwischen brcngcα, bccngcα und bocngcα scheinen daher von Proteinbereichen bestimmt zu werden, die außerhalb der eigentlichen Porenregion liegen. dmcngcα besitzt drei veränderte Aminosäuren im Porenbereich. An Position 320 von dmcngcα befindet sich ein Glutaminsäurerest, der in keiner anderen bekannten Sequenz vorkommt. Es wäre denkbar, daß dieser Aminosäureaustausch für die besondere Ca²⁺-Leitfähigkeit des *Drosophila*-Kanals verantwortlich ist.

Um die Proteinbereiche in den cng-Kanälen zu identifizieren, die die Ca²⁺-Wechselwirkung beeinflussen, wurden in verschiedene α-Untereinheiten Mutationen eingeführt, um anschließend die Ca²⁺-Blockierungseigenschaften in diesen Mutanten zu untersuchen. Die Mutanten waren häufig so konstruiert, daß ein Segment einer α-Untereinheit durch die entsprechende Sequenz einer anderen α-Untereinheit ersetzt wurde. Solche Konstrukte werden allgemein als Chimären bezeichnet. Ziel dieses Projektes war,

die Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften eines Kanals möglichst vollständig auf einen anderen Kanal zu übertragen. Die hohe Homologie zwischen den bekannten α -Untereinheiten läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß die Mutationen die transmembranale Topologie oder die Stöchiometrie der mutanten Kanäle verändern. Trotzdem gab es eine Reihe von Mutanten, die funktionell überhaupt nicht oder nur mit einer geringen Dichte exprimiert werden konnten. Die Gründe hierfür sind zur Zeit noch unklar.

3.2.1 Aminosäure-Austausche zwischen *brngcα* und *dmngcα*

Mutationen in *dmngcα* sollten überprüfen, ob zumindest in diesem Kanal Aminosäureaustausche in der Porenregion die Ursache für das unterschiedliche Ca^{2+} -Blockierungsverhalten waren. Untersucht wurden *dmngcα*(E320V) sowie eine weitere Mutante von *dmngcα*, die einige C-terminal über die Pore hinausgehende Austausche in der kurzen Schleife vor S_6 beinhaltete (*dmngcα*(T318P, E320V, N321K, V323E), siehe Anhang A.1 für die Sequenz von *dmngcα*). Diese Mutante wird mit *dm_Ch1* bezeichnet.

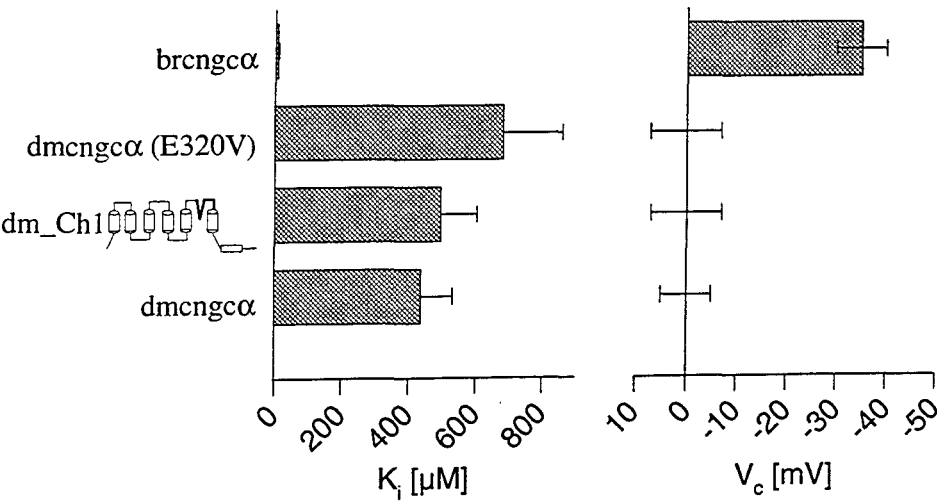


Abb.3.2.2: $K_{i,-80\text{mV}}$ und V_c für *dmngcα*(E320V) und für die Mutante *dm_Ch1* im Vergleich zu *brngcα* und *dmngcα*. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Links neben dem Balkendiagramm ist die Mutante *dm_Ch1* schematisch anhand des Topologiemodells (Abb.1.1) gezeichnet. Die dicken Linien kennzeichnen die Sequenz aus *brngcα*, dünne Linien entsprechend die Sequenz aus *dmngcα*.

Abb.3.2.2 zeigt die Ergebnisse der Blockierungsexperimente anhand der Parameter $K_{i,-80mV}$ und V_c . Links neben dem Balkendiagramm ist die Mutante dm_Ch1 schematisch anhand des Topologiemodells dargestellt. Die Sequenz aus dmngc α ist dünn gezeichnet, während die fetten Linien die Sequenz aus brngc α kennzeichnen. V_c ist in den mutierten Kanälen nicht von dmngc α verschieden ($V_c \approx 0$ mV). Die Werte für $K_{i,-80mV}$ scheinen in den mutierten Kanälen sogar noch etwas höher zu liegen als in dmngc α . Das Ziel, eine höhere Affinität des Kanals für Ca^{2+} -Ionen zu induzieren, wurde nicht erreicht. Daher kann der eigentliche Porenbereich als Ursache für die unterschiedliche Ca^{2+} -Wechselwirkung von dmngc α und brngc α ausgeschlossen werden.

3.2.2 Chimären zwischen brngc α und bocngc α

Um den Einfluß anderer, außerhalb der Pore gelegener Regionen auf das Kanalverhalten zu untersuchen, wurden Chimären zwischen brngc α und bocngc α untersucht, in denen größere Segmente der Proteine untereinander ausgetauscht wurden. Eine praktische Nomenklatur dieser Chimären ist, wenn nicht anders vermerkt, wie folgt:

R bedeutet Sequenz aus brngc α , O die entsprechende Sequenz aus bocngc α . Der erste Buchstabe kennzeichnet die Herkunft der N-terminalen Sequenz bis einschließlich des anschließend gekennzeichneten transmembranalen Segmentes. Der nächste Buchstabe kennzeichnet die Herkunft der nachfolgenden Sequenz usw. So ist $R_{S2}O_{S4}R$ eine Chimäre, die den N-Terminus und die ersten beiden transmembranalen Segmente S_1 und S_2 von brngc α , S_3 und S_4 aus bocngc α und S_5 , S_6 und den C-Terminus wieder aus brngc α besitzt. Einige Chimären hätten nach dieser Nomenklatur die gleiche Bezeichnung, da sie an unterschiedlichen Stellen innerhalb einer zytoplasmatischen oder extrazellulären Schleife fusioniert sind, die Nomenklatur aber nur die transmembranale Topologie beinhaltet. Eine der unterschiedlichen Chimären wird dann mit ' (prime) gekennzeichnet (z.B. $R_{S2}O$, $R_{S2}O'$). Die genaue Beschreibung der Chimären mit allen Fusionsstellen ist im Anhang A.2 aufgeführt.

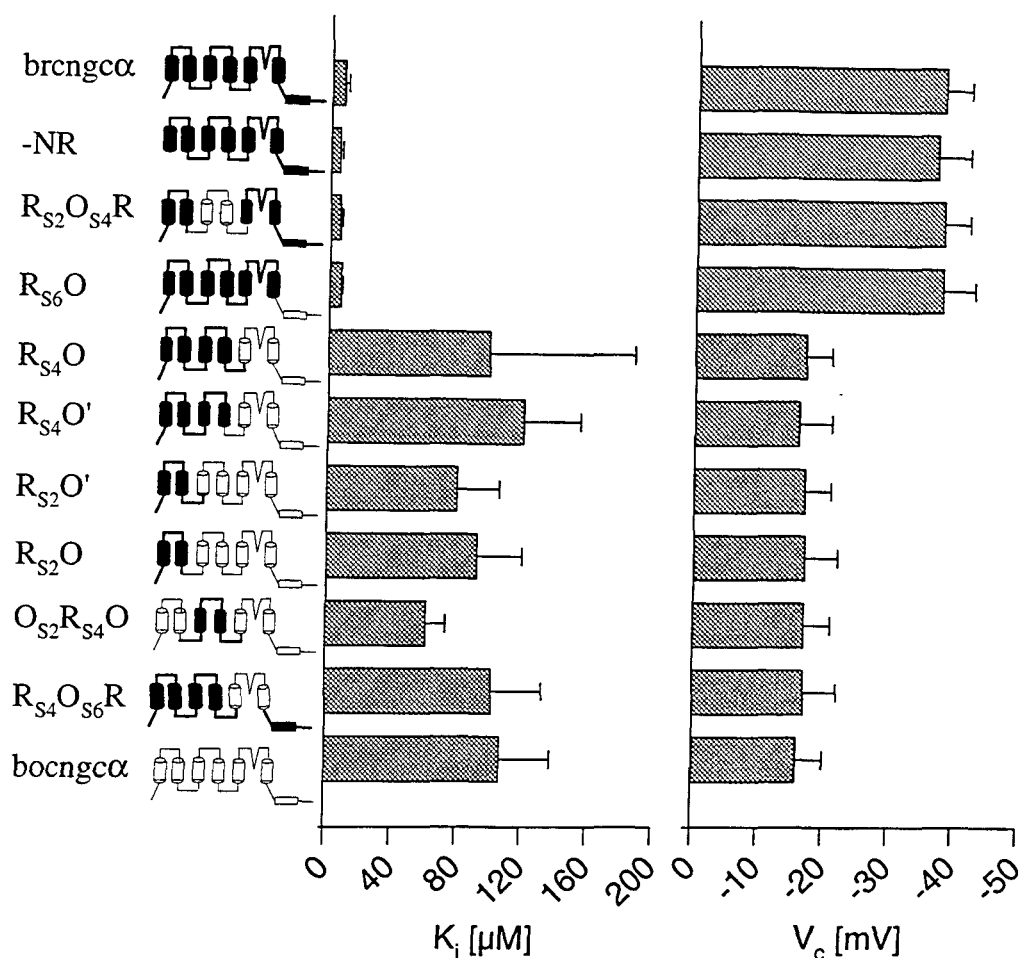


Abb.3.2.3: K_{i-80mV} (links) und V_c (rechts) für die Chimären aus brcngc α und bocngc α . Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Links neben dem Balkendiagramm sind die Chimären schematisch anhand des Topologiemodells (Abb.1.1) gezeichnet. Die dicken Linien kennzeichnen die Sequenz aus brcngc α , dünne Linien entsprechend die Sequenz aus bocngc α . Siehe Anhang A.2 für die exakte Beschreibung der Chimären mit allen Fusionsstellen.

Abb.3.2.3 faßt die Ergebnisse der untersuchten Chimären zwischen brcngc α und bocngc α zusammen. Die Werte für K_{i-80} und V_c der Chimären R_{S2}O, R_{S2}O', R_{S4}O, R_{S4}O' und O_{S2}R_{S4}O ähneln denen von bocngc α . Demgegenüber verhalten sich die Chimären -NR (brcngc α , N-Terminus fehlt), R_{S2}O_{S4}R und R_{S6}O in ihrer Blockierung wie brcngc α . Danach scheinen weder der N-Terminus, noch die transmembranalen Segmente S₁ bis S₄, noch der C-Terminus einen signifikanten Einfluß auf die Blockierungseigenschaften von cng-Kanälen zu haben. Hingegen zeigt die Chimäre R_{S4}O_{S6}R, daß die Bereiche S₅, Pore und S₆ (S₅-P-S₆) für die Ca²⁺-Leitfähigkeit entscheidend sind. Der K_{i-80mV} -Wert dieser

Chimäre beträgt $101.6 \pm 31 \mu\text{M}$, V_c liegt bei $-19 \pm 5 \text{ mV}$. Abb 3.2.4 (links) zeigt den entscheidenden Übergang von dem schwachblockierten, „olf-artigen“ Kanal $R_{S4}O$ zu dem starkblockierten „rod-artigen“ $R_{S6}O$ anhand der Spannungsabhängigkeit von K_i (vergleiche mit Abb.3.1.6, rechts). Die Werte für $K_{i-80\text{mV}}$ und V_c betragen $119.8 \pm 34.5 \mu\text{M}$ und -16 mV für $R_{S4}O$ sowie $6.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ und -38 mV für $R_{S6}O$.

Abb.3.2.4 (rechts) zeigt schließlich die Spannungsabhängigkeit von K_i der Chimäre $R_{S4}O_{S6}R$ im Vergleich zu $\text{bocngc}\alpha$. Obwohl dieser Kanal überwiegend Sequenzabschnitte aus $\text{brcngc}\alpha$ besitzt, verhält er sich hinsichtlich der Wechselwirkung mit $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wie $\text{bocngc}\alpha$.

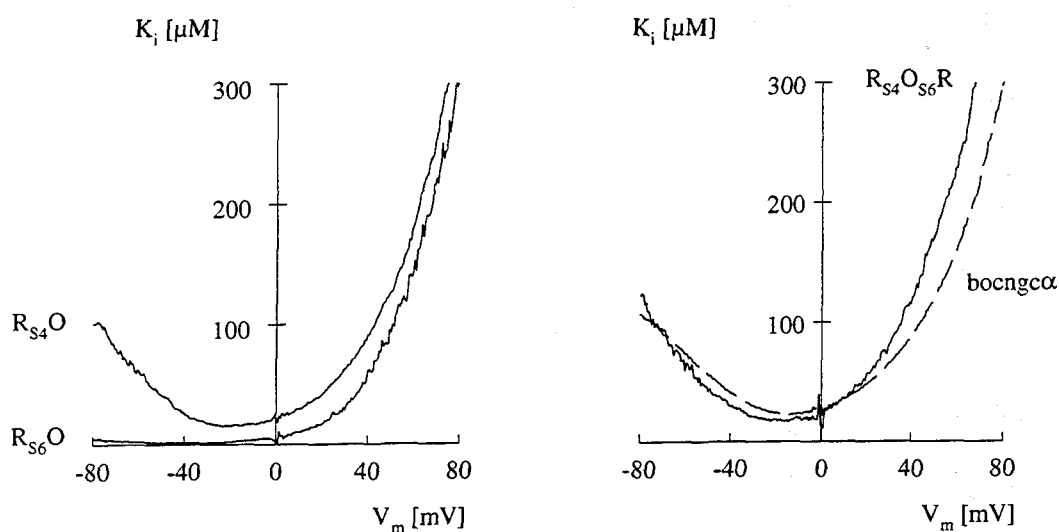


Abb.3.2.4: Spannungsabhängigkeit von K_i für die Chimären $R_{S4}O$ und $R_{S6}O$ (links), sowie $R_{S4}O_{S6}R$ und $\text{bocngc}\alpha$ (rechts).

3.2.3 Chimären und Punktmutanten zwischen $\text{brcngc}\alpha$ und $\text{bcngc}\alpha$

Chimären zwischen $\text{brcngc}\alpha$ und $\text{bcngc}\alpha$ wurden untersucht, um herauszufinden, ob der Bereich S_5 -P- S_6 die Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften auch zwischen den Kanälen aus Sehstäbchen und Zapfen überträgt. Um herauszufinden, ob einzelne Aminosäuren für die Veränderung der Wechselwirkung der Kanäle mit Ca^{2+} -Ionen verantwortlich sind, wurden darüberhinaus weitere Chimären und Punktmutanten untersucht.

Die Nomenklatur der Chimären zwischen $\text{brngc}\alpha$ und $\text{bccngc}\alpha$ ist wie die zwischen $\text{brngc}\alpha$ und $\text{bocngc}\alpha$ (hier bezeichnet C die Sequenz aus $\text{bccngc}\alpha$). Einige der Chimären wurden innerhalb der Pore fusioniert. Diese Fusionsstelle ist mit Po (Po für Pore) abgekürzt.

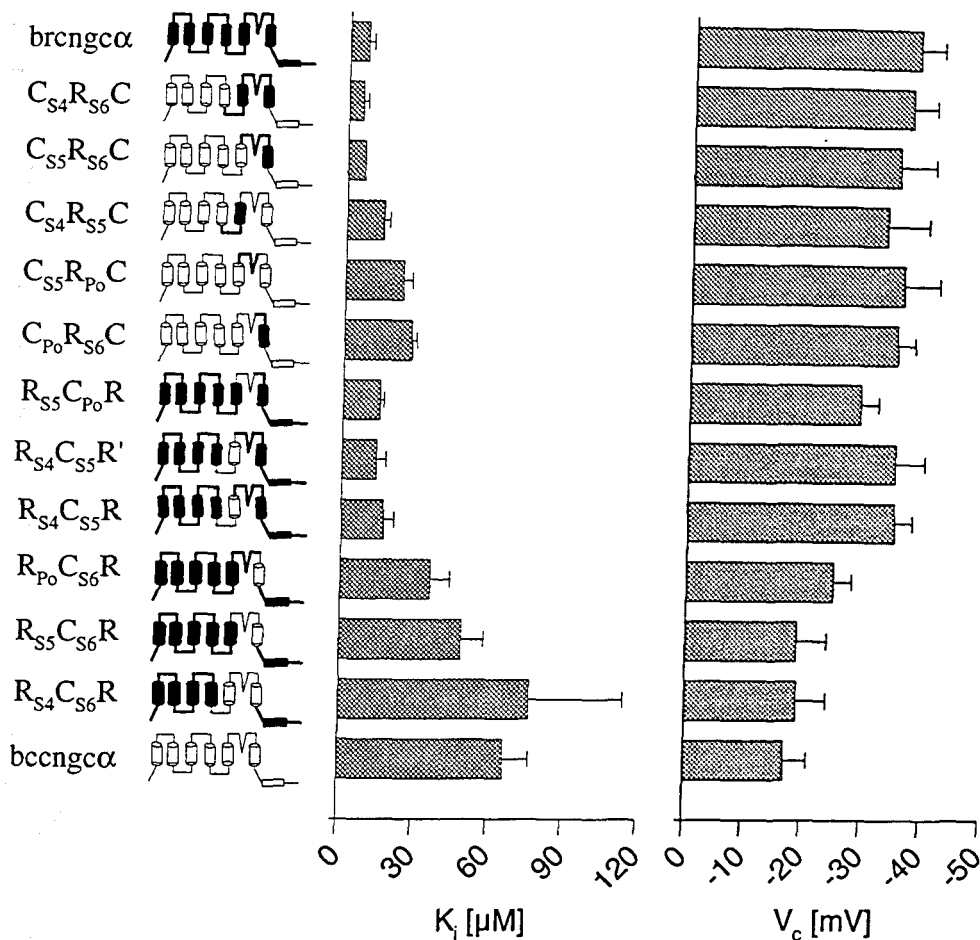


Abb.3.2.5: $K_{i, -80\text{mV}}$ (links) und V_c (rechts) für die Chimären aus $\text{brngc}\alpha$ und $\text{bccngc}\alpha$. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Links neben dem Balkendiagramm sind die Chimären schematisch anhand des Topologiemodells (Abb.1.1) gezeichnet. Die dicken Linien kennzeichnen die Sequenz aus $\text{brngc}\alpha$, dünne Linien entsprechend die Sequenz aus $\text{bccngc}\alpha$. Siehe Anhang A.3 für die exakte Beschreibung der Chimären mit allen Fusionsstellen.

Die Ergebnisse der Chimären zwischen $\text{brngc}\alpha$ und $\text{bccngc}\alpha$ sind in Abb.3.2.5 zusammengefaßt. Die Chimären $\text{R}_{\text{S4}}\text{C}_{\text{S6}}\text{R}$ (siehe Abb.3.2.5, zweite von unten) und $\text{C}_{\text{S4}}\text{R}_{\text{S6}}\text{C}$ (siehe Abb.3.2.5, zweite von oben) bestätigen das bisherige Ergebnis, daß durch Austausch

des S₅-P-S₆-Bereiches die charakteristische Ca²⁺-Wechselwirkung ebenfalls zwischen den Kanälen aus Photorezeptoren ausgetauscht werden kann. Der K_{i,-80mV}-Wert für R_{S4}C_{S6}R beträgt $76.3 \pm 37.8 \mu\text{M}$, der Wert für C_{S4}R_{S6}C beträgt $5.8 \pm 2 \mu\text{M}$. Die V_c-Werte sind -19 mV für R_{S4}C_{S6}R bzw. -37 mV für C_{S4}R_{S6}C.

Die weitere Verkleinerung der ausgetauschten Segmente zeigte, daß sowohl S₅ (R_{S4}C_{S5}R, C_{S4}R_{S5}C), als auch die Schleife vor der Pore (R_{S5}C_{P0}R, C_{S5}R_{P0}C) und S₆ (R_{P0}C_{S6}R, C_{P0}R_{S6}C) einen modulierenden Einfluß auf die Blockierung besitzen. Tauscht man die Schleife vor der Pore zusammen mit S₆ aus, so erhält man etwas größere Änderungen (R_{S5}C_{S6}R, C_{S5}R_{S6}C) als durch Austausch der jeweils einzelnen Bereiche.

Die Punktmutanten in den Bereichen S₅ und S₆ hatten, wenn überhaupt, nur eine kleine Wirkung auf die Blockierung. Den größten Einfluß hatte ein Phenylalanin / Leucin-Austausch im S₆ Segment (brcngcα(F374L), bccngcα(L395F), siehe Abb.3.2.6). Keine der untersuchten Aminosäuren konnte für den Einfluß eines gesamten Segmentes, aus dem sie stammte, verantwortlich gemacht werden. Vermutlich addiert sich die modulierende Wirkung einzelner Aminosäuren zu den beobachteten Unterschieden. Die Ergebnisse der Punktmutationen sind in Abb.3.2.6 zusammengefaßt. Bemerkenswert sind die veränderten V_c-Werte für Mutationen an der Position 318 in brcngcα bzw. an der entsprechenden Position 342 in bccngcα. Mutationen dieser in S₅ gelegenen Aminosäure in hrcngcα werden mit einigen seltenen Fällen von *Retinitis pigmentosa* in Zusammenhang gebracht (Huang *et al.*, 1995).

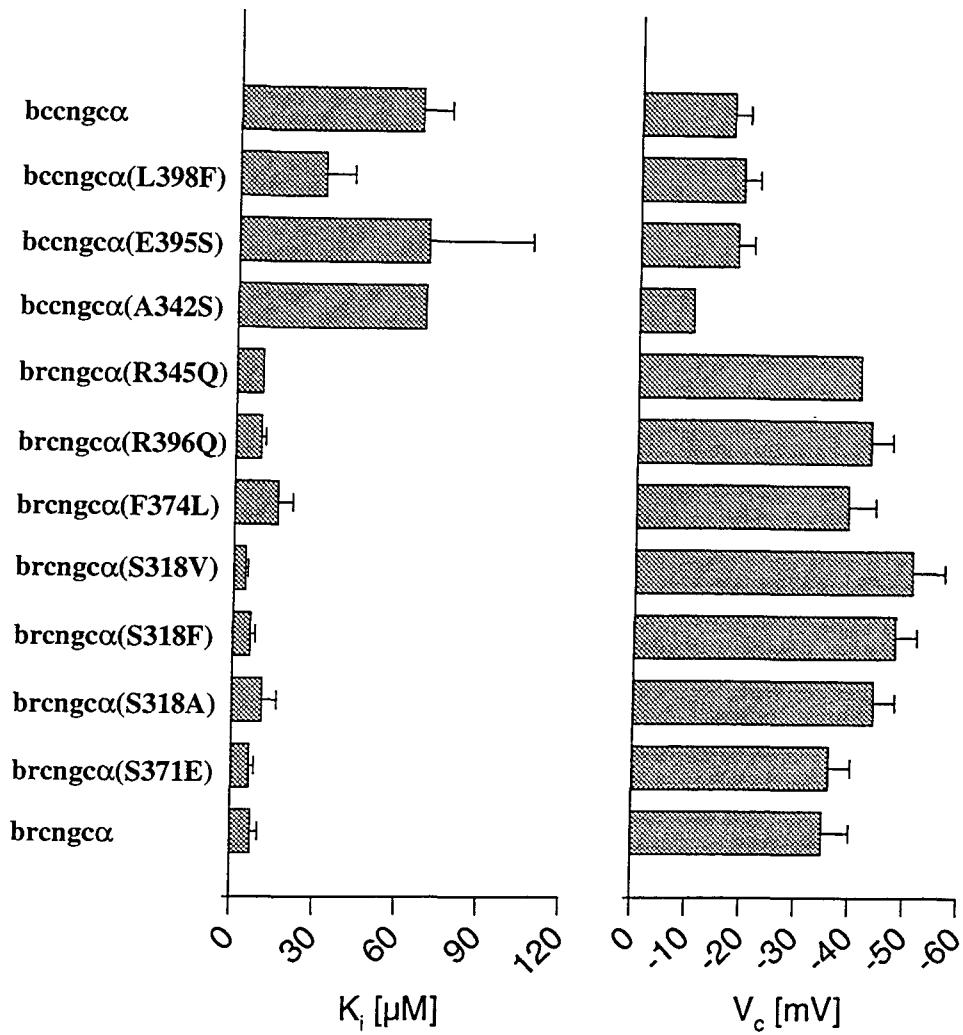


Abb.3.2.6: $K_{i,-80\text{mV}}$ (links) und V_c (rechts) für die untersuchten Einzelpunktmutanten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Bezeichnungen neben dem Balkendiagramm kennzeichnen die α -Untereinheit, in der die Mutation eingeführt wurde. In Klammern ist der Aminosäureaustausch mit der entsprechenden Position im Polypeptid gekennzeichnet (siehe Anhang A.1 für die Gesamtsequenz der α -Untereinheiten).

3.2.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurden verschiedene mutierte α -Untereinheiten auf ihre Wechselwirkung mit $[Ca^{2+}]_a$ untersucht, um die Proteinbereiche zu identifizieren, die für die Unterschiede zwischen den verschiedenen cng-Kanälen verantwortlich sind. Mutationen in dmcng α und Sequenzvergleiche im Porenbereich der anderen α -Untereinheiten schlossen die eigentliche Pore als Ursache für die beobachteten Unterschiede aus. Die Chimären zwischen brngc α und bocngc α , sowie zwischen brngc α und bccngc α zeigten, daß der S₅-P-S₆-Bereich eines Kanals seine spezifische Ca²⁺-Wechselwirkung bestimmt. Andere Proteinbereiche scheinen keinen signifikanten Einfluß auf die Ca²⁺-Blockierung zu haben.

Es zeigte sich, daß sowohl S₅, als auch die extrazelluläre Aminosäureschleife vor der Pore und S₆ die Ca²⁺-Blockierung modulieren. Einzelne Aminosäuren konnten für die beobachtete Wirkung nicht verantwortlich gemacht werden. Eine Überlagerung des Einflusses von verschiedenen Aminosäurepositionen scheint vorzuliegen.

3.3 Mechanismus der Modulation der Ca^{2+} -Blockierung

Die Blockierung der cng-Kanäle hängt von der Affinität ab, mit der Ca^{2+} -Ionen in der Pore gebunden werden. Die Komplexierung durch Glutaminsäurereste wird von zwei Faktoren bestimmt: (1) Sterische Anordnung der Glutaminsäuren und (2) ihr Protonierungsgrad.

Die pK_a -Werte der Protonierung von Aminosäureseitenketten (insbesondere Glu und Asp) in freier Lösung unterscheiden sich von denen im gefalteten Protein, da andere funktionelle Gruppen in der Umgebung die lokale Dielektrizitätskonstante beeinflussen. Die pK_a -Werte in Proteinen können sich über mehrere Größenordnungen erstrecken (Fersht, 1985). Für den cng-Kanal aus olfaktorischen sensorischen Neuronen des Katzenwelses (focngc α) konnte gezeigt werden, daß in der Porenregion zwei unabhängige protonierbare Gruppen existieren, die beide einen pK_a -Wert von 7.6 besitzen (Root & MacKinnon, 1994). Durch Austausch des Glu-Restes in der Pore ging die pH-Abhängigkeit verloren. Dieses Ergebnis zeigt, daß wahrscheinlich die Carboxylgruppe dieser Aminosäure den pH-Effekt vermittelt (Root & MacKinnon, 1994). Es ist denkbar, daß in anderen cng-Kanälen die pK_a -Werte der Glu-Reste durch die unterschiedliche Proteinumgebung anders sind. Bei gleichem pH-Wert wäre die Ca^{2+} -Bindestelle in den verschiedenen cng-Kanälen dann mehr oder weniger stark protoniert. Der unterschiedliche Protonierungsgrad könnte für die unterschiedliche Wechselwirkung von cng-Kanälen mit Ca^{2+} -Ionen verantwortlich sein.

Ein zweiter Faktor, der die Ca^{2+} -Affinität beeinflusst, ist die räumliche Anordnung der vier Glu-Reste. Ca^{2+} -Bindestellen mit hoher Affinität zeichnen sich durch sterische Anordnung mehrerer Sauerstoffgruppen aus, die das Ca^{2+} -Ion komplexieren. Die Geometrie dieser Bindestellen ist entscheidend für die hohe Selektivität für Ca^{2+} -Ionen (Falke *et al.*, 1994). Geringe Änderungen in dieser Geometrie können zu starken Veränderungen in der Bindungsaffinität führen (Falke *et al.*, 1994). Es ist denkbar, daß die in cng-Kanälen identifizierten Proteinbereiche, die die Ca^{2+} -Wechselwirkung beeinflussen ($\text{S}_5\text{-P-S}_6$), eine andere Packungsdichte des erweiterten Porenbereiches bewirken und dadurch die Koordinationsgeometrie für Ca^{2+} -Ionen verändern. Im folgenden wird versucht, den Einfluß des Protonierungsmusters bzw. den der Koordination getrennt voneinander zu untersuchen.

3.3.1 Einfluß von Protonen auf die Blockierung der Kanäle durch $[Ca^{2+}]_a$

Der Einfluß von Protonen auf die Ca^{2+} -Blockierung wurde an outside-out-patches von *Xenopus* Oozyten gemessen. Es wurden Blockierungsexperimente bei $[Ca^{2+}]_a = 50 \mu M$ und bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Der pH-Wert war bei diesen Messungen auf beiden Seiten der Membran gleich.

Abb.3.3.1 zeigt die Spannungsabhängigkeit von I/I_{max} für bocngc α (links) und für brncgc α (rechts). bocngc α zeigt bei pH 5.5 und $50 \mu M Ca^{2+}$ praktisch keine Blockierung des maximalen Stromes ($I/I_{max} \approx 1$). Mit steigendem pH-Wert wird der spannungsabhängige Block immer ausgeprägter. Hierbei fällt auf, daß sich V_c mit dem pH-Wert nicht signifikant ändert ($V_c \approx -16 mV$).

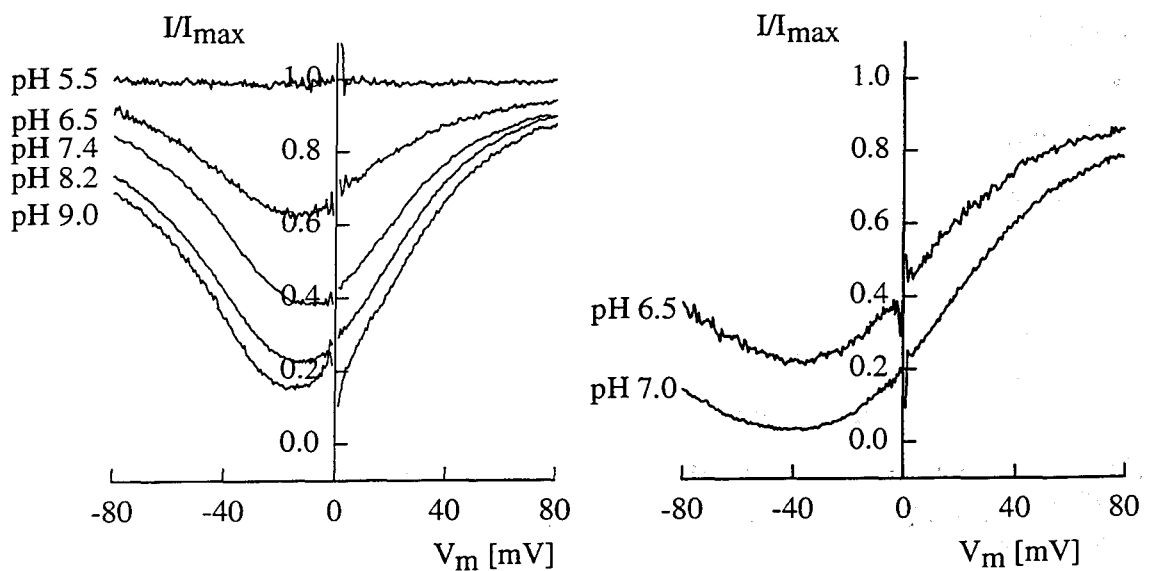


Abb.3.3.1: Spannungsabhängigkeit von I/I_{max} bei $50 \mu M [Ca^{2+}]_a$ unter variierenden symmetrischen pH-Bedingungen für bocngc α (links) und brncgc α (rechts). Die Kurven sind Mittelwerte aus mindestens fünf (bocngc α) bzw. drei (brncgc α) Versuchen.

Abb.3.3.1 (rechts) zeigt die Ergebnisse für brncgc α bei pH 6.5 und pH 7.0. Auch hier scheint V_c ($\approx -40 mV$) nicht durch den pH-Wert verändert zu werden. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Blockierungseffizienz scheint für brncgc α etwas ausgeprägter zu sein als für bocngc α .

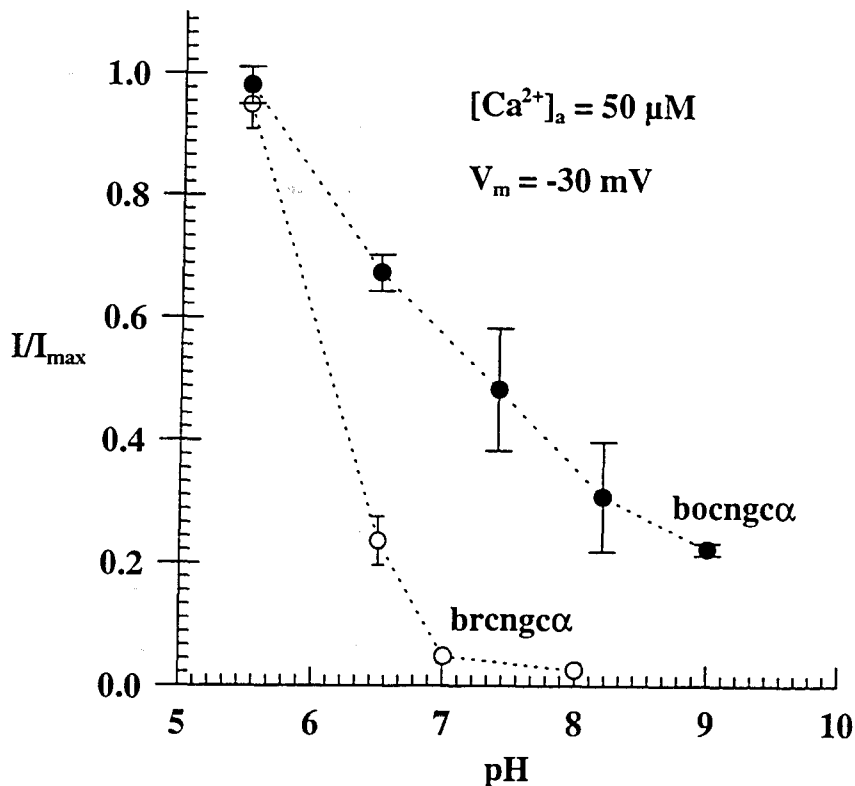


Abb.3.3.2: pH-Abhängigkeit von I/I_{\max} für die Messungen aus 3.3.1 bei -30 mV. (Werte für pH 5 und pH 8 von brncg α wurden in anderen Messungen bestimmt.)

Abb.3.3.2 zeigt die pH-Abhängigkeit von I/I_{\max} (bei -30 mV) für die beiden Kanäle. Um I/I_{\max} für bocngc α von 0.9 auf 0.1 zu erniedrigen, muß man den pH-Wert um mehr als 3 pH-Einheiten erhöhen. Dies deutet auf ein komplexes Protonierungsverhalten in diesem Kanal. Demgegenüber sinkt bei brncg α I/I_{\max} von 0.9 auf 0.1 bereits, wenn man den pH-Wert um etwas mehr als eine Einheit erhöht. Die Ergebnisse weisen auf unterschiedliche Protonierungsmuster in der Pore von brncg α und bocngc α hin und könnten eine Erklärung für die charakteristische Ca^{2+} -Wechselwirkung der einzelnen cng-Kanäle liefern.

3.3.2 Einfluß von Protonen in Abwesenheit von Ca^{2+}

Da sich die Bindung von Ca^{2+} -Ionen und Protonen an der Bindestelle gegenseitig beeinflussen können, wurde die pH-Abhängigkeit des Stromes, der durch cng-Kanäle fließt, auch in Abwesenheit von Ca^{2+} untersucht. Der Einfluß von extrazellulären Protonen

auf den maximalen Strom durch cng-Kanäle wurde an outside-out-patches von *Xenopus* Oozyten oder von HEK 293-Zellen gemessen. Die Messungen wurden mit 150 mM K^+ auf beiden Seiten der Membran durchgeführt, wobei der pH-Wert der extrazellulären Lösung von pH 5 bis pH 9 variiert wurde. Die Werte wurden bei -80 mV gemessen, um den Einfluß des konstanten intrazellulären pH-Wertes ($pH_i = 7.4$) möglichst gering zu halten.

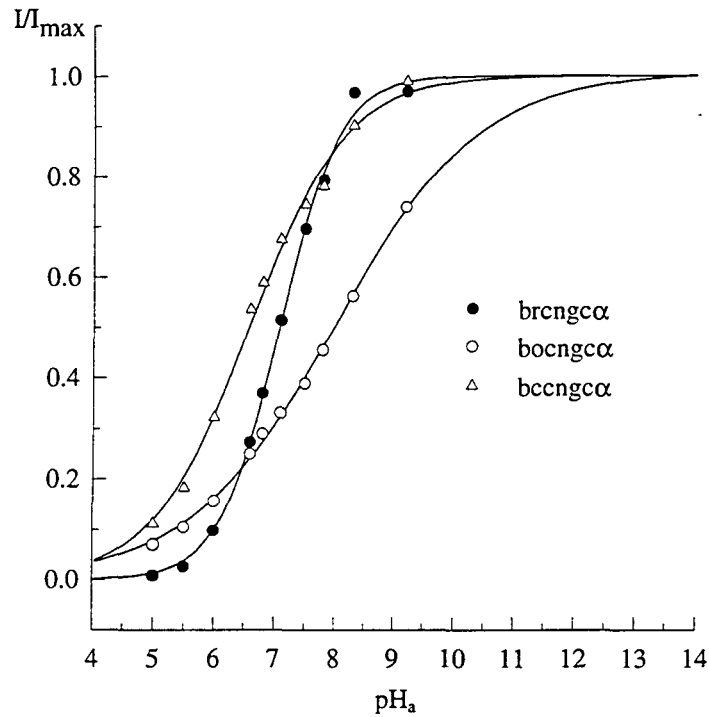


Abb.3.3.3: Abhängigkeit der normierten Ströme I/I_{max} vom extrazellulären pH-Wert (pH_a) bei -80 mV. Der pH-Wert der Pipettenlösung betrug 7.4. Die durchgezogenen Linien wurden nach der modifizierten Hillgleichung $I/I_{max} = 1 - c^n / (c^n + K^n)$ berechnet (mit c : Protonenkonzentration, K : Protonen-Bindungskonstante, n : Hillkoeffizient. Die Parameter waren für $brcngc\alpha$: ($n = 0.89$, $K = 8.38 \cdot 10^{-8}$ M, $bccngc\alpha$: ($n = 0.55$, $K = 2.66 \cdot 10^{-7}$ M), $bocngc\alpha$: ($n = 0.36$, $K = 8.38 \cdot 10^{-8}$ M).

Abb.3.3.3 zeigt die pH-Abhängigkeit der auf I_{max} normierten Ströme für $brcngc\alpha$ (●), $bocngc\alpha$ (○) und $bccngc\alpha$ (Δ). Die durchgezogenen Linien wurden nach der modifizierten Hillgleichung $I/I_{max} = K^n / (K^n + c^n)$ berechnet.

Die Titrationskurven für $bccngc\alpha$ und $bocngc\alpha$ sind weniger steil als die für $brcngc\alpha$. Das deutet auf unterschiedliche Wechselwirkung von Protonen mit den einzelnen Kanälen hin. Der Hillkoeffizient n für die drei Kanaltypen beträgt 0.90 ± 0.13 für $brcngc\alpha$, 0.56 ± 0.15

für $\text{bccng}\alpha$, und 0.35 ± 0.09 für $\text{bocng}\alpha$. Die geringen Werte für n , die hier für $\text{bccng}\alpha$ und $\text{bocng}\alpha$ gefunden wurden, könnten ein Anzeichen dafür sein, daß es sich bei der Titration um eine Überlagerung mehrerer pH-abhängiger Gruppen handelt, die unterschiedliche pK_a -Werte besitzen.

3.3.3 Einfluß der Koordination auf die Ca^{2+} -Affinität

Um den Einfluß einer veränderten räumlichen Anordnung der Bindestelle auf die Wechselwirkung von cng -Kanälen mit Ca^{2+} -Ionen zu studieren, wurden die Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften von $\text{brcng}\alpha(\text{E363D})$ untersucht. In dieser Mutante ist die Glutaminsäure im Porenbereich von $\text{brcng}\alpha$ durch eine Asparaginsäure ersetzt worden, die eine etwas kürzere Seitengruppe besitzt. Es könnte sein, daß die Carboxylgruppen innerhalb der Pore deshalb weiter voneinander entfernt liegen. Abb.3.3.4 zeigt die IV_m -Kurven (oben, links), die Spannungsabhängigkeit von II_{max} (oben, rechts) und die Spannungsabhängigkeit der Blockierungskonstante K_i (unten, links). In Abb.3.3.4 (unten, rechts) sind im Vergleich K_i - V_m -Kurven für $\text{brcng}\alpha(\text{E363D})$ und für $\text{brcng}\alpha$ dargestellt. $\text{brcng}\alpha(\text{E363D})$ besitzt eine etwa 5-fach höhere Affinität für Ca^{2+} -Ionen bei -80 mV ($K_{i,-80\text{mV}} = 1.3 \text{ }\mu\text{M}$) als $\text{brcng}\alpha$ ($K_{i,-80\text{mV}} = 7.4 \text{ }\mu\text{M}$), jedoch eine etwa 50-fach höhere Affinität bei $+80 \text{ mV}$ ($K_{i,+80\text{mV}} = 8 \text{ }\mu\text{M}$) für $\text{brcng}\alpha(\text{E363D})$ im Vergleich zu $\approx 300 \text{ }\mu\text{M}$ für $\text{brcng}\alpha$ (beachte den logarithmischen Maßstab).

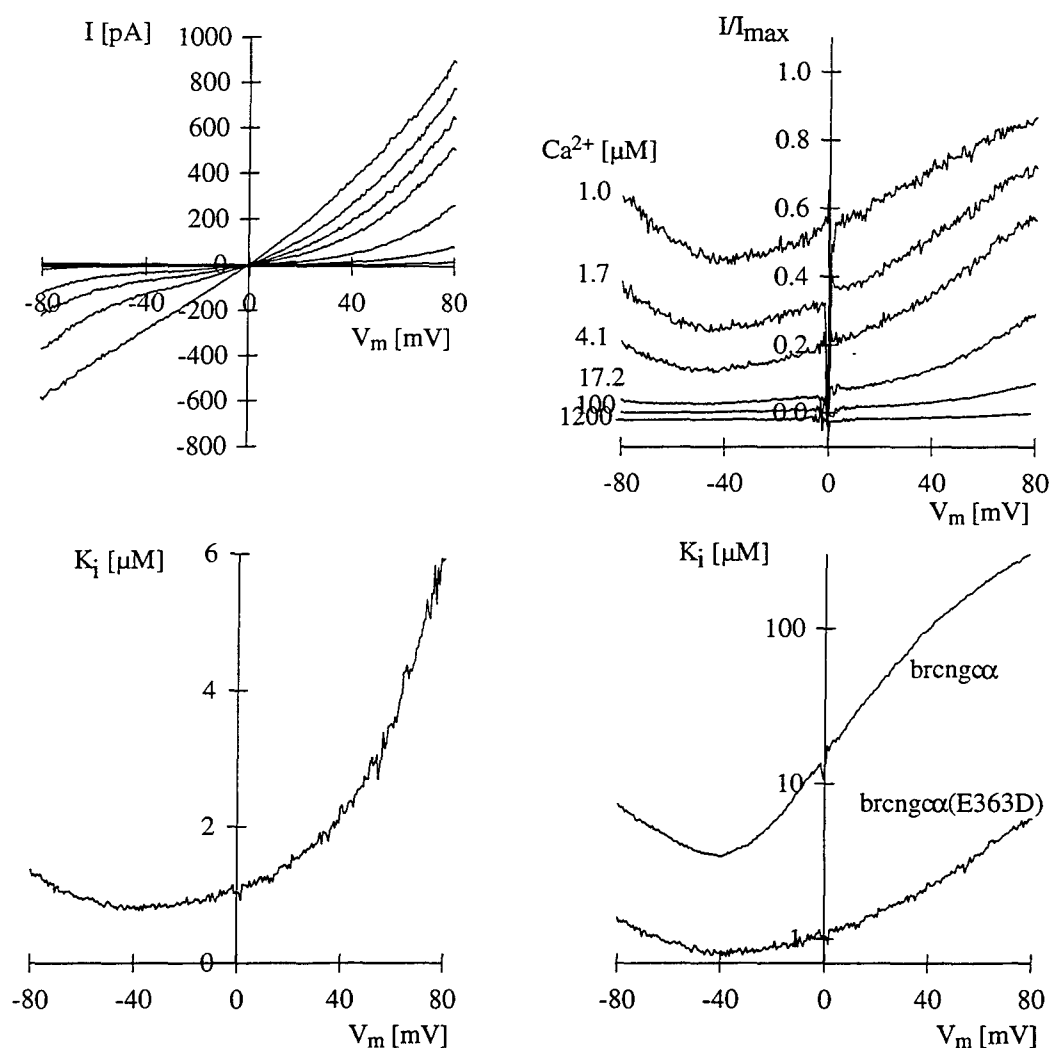


Abb.3.3.4: Makroskopische Strom-Spannungsbeziehung (links) und der nicht blockierte Anteil des Stromes I/I_{max} (rechts) der Mutante $brcng\alpha(E363D)$ bei verschiedenen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Pipette enthielt 1 mM cGMP, um die Kanäle zu aktivieren (outside-out Konfiguration). Die Ca^{2+} -Konzentrationen sind an den jeweiligen I/I_{max} -Kurven angegeben. (unten): Spannungsabhängigkeit des K_i -Wertes der Mutante alleine (links) und im Vergleich mit $brcng\alpha$ (rechts). Beachte die logarithmische Skala der K_i -Achse in der Abbildung rechts unten.

Es ist nicht auszuschließen, daß die Mutation im Porenbereich auch das Protonierungsmuster verändert. Daher wurde $brcng\alpha(E363D)$ auch auf seine Wechselwirkung mit extrazellulären Protonen untersucht. Abb.3.3.5 zeigt die pH-Abhängigkeit von I/I_{max} für die Mutante (●) im Vergleich zu $brcng\alpha$ (○). Bei pH 5 fließt

durch die Mutante noch ein nennenswerter Strom, im Gegensatz zu $\text{brncg}\alpha$, der praktisch vollständig durch Protonen blockiert ist. Ansonsten verlaufen die Kurven aber ähnlich. Die apparenten pK_a -Werte dieser beiden Kanäle unterscheiden sich kaum. Daher kann man davon ausgehen, daß diese Mutation im wesentlichen die Koordinations-Geometrie der Ca^{2+} -Bindestelle verändert. Die Ergebnisse zeigen, daß Veränderungen in der Koordination von Ca^{2+} einen bedeutenden Einfluß haben können. Die Variationen in der räumlichen Anordnung der Bindestelle, die durch den S_5 - P - S_6 -Bereich in den verschiedenen Kanälen bewirkt werden kann, ist sicherlich nicht so groß wie die Änderung in der hier untersuchten Mutante. Die Modulation der Ca^{2+} -Wechselwirkung durch diesen Mechanismus ist aber durchaus möglich.

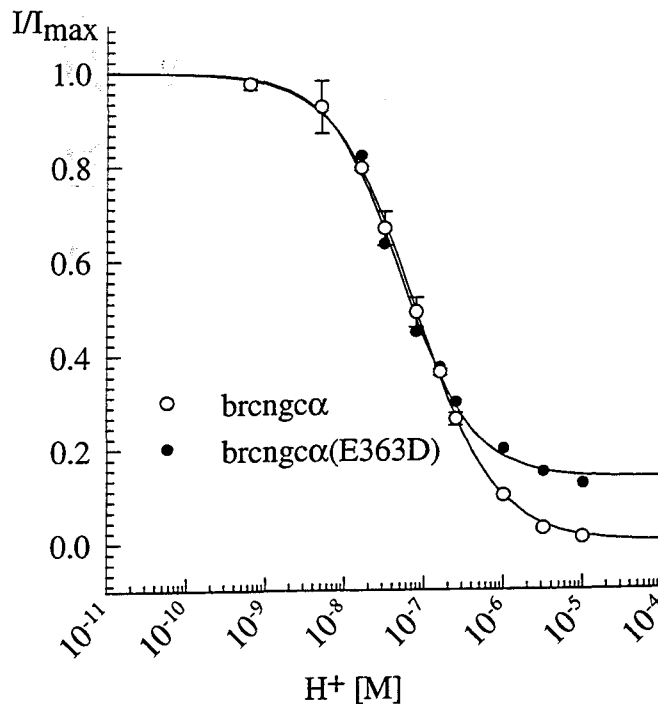


Abb.3.3.5: Abhängigkeit der normierten Ströme I/I_{max} vom extrazellulären pH bei -80 mV. Der pH-Wert der Pipettenlösung betrug 7.4. Die durchgezogenen Linien wurden nach der modifizierten Hillgleichung berechnet: $I/I_{\text{max}} = 1 - c^n / (c^n + K^n)$ (mit c : Protonenkonzentration, K : Protonen-Bindungskonstante, n : Hillkoeffizient) für $\text{brncg}\alpha$ und $I/I_{\text{max}} = 1 - (1 - I_{\text{min}} / I_{\text{max}}) \cdot c^n / (c^n + K^n)$ (mit $I_{\text{min}} / I_{\text{max}}$: minimaler Wert der Kurve) für $\text{brncg}\alpha(\text{E363D})$. Die Parameter waren für $\text{brncg}\alpha$ ($n = 0.86$, $K = 7.7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$), $\text{brncg}\alpha(\text{E363D})$: ($n = 0.96$, $K = 5.06 \cdot 10^{-8}$), $I_{\text{min}} / I_{\text{max}} = 0.14$).

3.3.4 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde versucht, jene Faktoren herauszufinden, die in cng-Kanälen zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung mit Ca^{2+} führen können. Es zeigte sich, daß extrazelluläre Protonen in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen die cng-Kanäle unterschiedlich beeinflussen. Die flachen Titrationskurven (s. Abb.3.3.3) für bccngc α und besonders für bocngc α könnten als Überlagerung mehrerer pH-abhängiger Gruppen interpretiert werden. Die relativ flache pH-Abhängigkeit von bocngc α bleibt erhalten, wenn man in Anwesenheit von Ca^{2+} mißt. Im Gegensatz dazu ist die Titrationskurve von brcngc α unabhängig von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ immer steiler ($n \approx 0.9$) als die von bocngc α .

Die Ergebnisse zeigen, daß die Protonierung von titrierbaren Gruppen tatsächlich einen großen Einfluß auf die Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften hat und daß sich cng-Kanäle wahrscheinlich im Protonierungsgrad der Pore unterscheiden.

Die Untersuchungen an brcngc α (E363D) zeigen, daß durch Änderung der Koordinationsgeometrie der Ca^{2+} -Bindestelle massive Änderungen der Affinität dieser Bindestelle für Ca^{2+} -Ionen induziert werden können. Die hier vorgelegten Ergebnisse schließen daher nicht aus, daß der S₅-P-S₆-Bereich sowohl das Protonierungsmuster als auch die Geometrie der Ca^{2+} -Bindestelle moduliert.

3.4 Modulation der Blockierung durch andere Faktoren

3.4.1 Einfluß der β -Untereinheit auf die Ca^{2+} -Blockierung von brcngc α und bccngc α

Die nativen Kanäle in Sehtäbchen bilden heterooligomere Komplexe, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen (Chen *et al.*, 1993; Körschen *et al.*, 1995). Inzwischen ist auch aus Hodengewebe die cDNA einer β -Untereinheit kloniert worden (btcngc β , Biel *et al.*, 1996, Weiner, 1996). In Rinderspermien konnte gezeigt werden, daß diese β -Untereinheit zusammen mit bccngc α koexprimiert wird (Weiner, 1996). Interessanterweise zeigen die immunhistochemischen Bilder, daß der cng-Kanal im Schwanz der Spermien sowohl als α -Homooligomer als auch als Heterooligomer aus α - und β -Untereinheiten vorliegen könnte (Weiner, 1996).

Die β -Untereinheiten haben in der Porenregion einen entscheidenden Aminosäureaustausch: Die Glutaminsäure, die in allen α -Untereinheiten konserviert ist und die die Bindestelle für Ca^{2+} -Ionen ausbildet, ist in den β -Untereinheiten durch ein Glyzin ersetzt. Der Einfluß der β -Untereinheit auf die Blockierung durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ wurde daher untersucht.

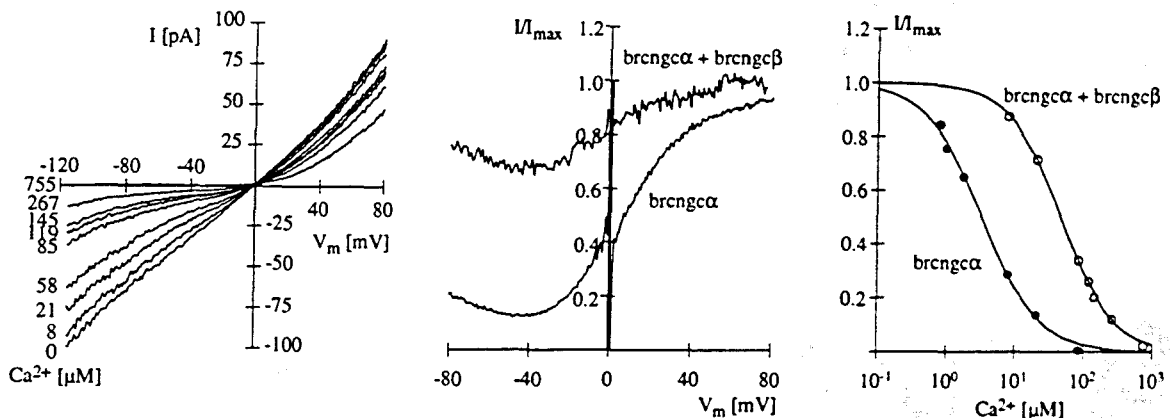


Abb.3.4.1: Blockierung heterooligomerer Kanäle aus brcngcα und brcngcβ

Makroskopische Strom-Spannungsbeziehungen (links) des heterooligomeren Kanals in Gegenwart verschiedener extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Pipettenlösung enthielt 1 mM cGMP, um die Kanäle zu aktivieren (outside-out Konfiguration). Die Ca^{2+} -Konzentrationen sind an den jeweiligen Kurven angegeben. (Mitte): Vergleich der Spannungsabhängigkeit von I/I_{max} bei 21 μM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ des heterooligomeren Kanals im Vergleich zu brcngcα. (rechts): Dosis-Wirkungskurve (bei -60 mV) für die Ca^{2+} -Blockierung des heterooligomeren Kanals (o) im Vergleich zum homooligomeren Kanal (•). Die durchgezogene Linie wurde nach der modifizierten Hillgleichung $I/I_{\text{max}} = 1 - c^n / (c^n + K_i^n)$ berechnet mit $K_i = 46.5 \mu\text{M}$, $n = 1.0$ (Heterooligomer) und $K_i = 3.3 \mu\text{M}$, $n = 1.0$ (Homooligomer).

Abb.3.4.1 zeigt die Ergebnisse der Ca^{2+} -Blockierungsexperimente für Kanäle, die durch Koexpression von brcngcα und brcngcβ erhalten wurden. Die I/V_m -Kurve in Abb.3.4.1 (links) ist, ähnlich wie beim homooligomeren Kanal, nahezu linear. Durch Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ergeben sich ein- und auswärts rektifizierende I/V_m -Kurven. Einwärtsströme werden stärker blockiert als Auswärtsströme. In Abb.3.4.1 (Mitte) werden I/I_{max} -Kurven (bei 21 μM $[\text{Ca}^{2+}]_a$) für brcngcα und für brcngcα + brcngcβ verglichen. Die Wirkung von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ ist im heterooligomeren Kanal im Vergleich zum homooligomeren Kanal reduziert. Abb.3.4.1 (rechts) zeigt die Dosis-Wirkungskurven für die Ca^{2+} -Blockierung bei

$V_m = -70$ mV. Die Mittelwerte für K_i betragen 45.0 ± 6.6 μ M für den heterooligomeren Kanal im Vergleich zu 7.4 ± 2.5 μ M für den homooligomeren Kanal.

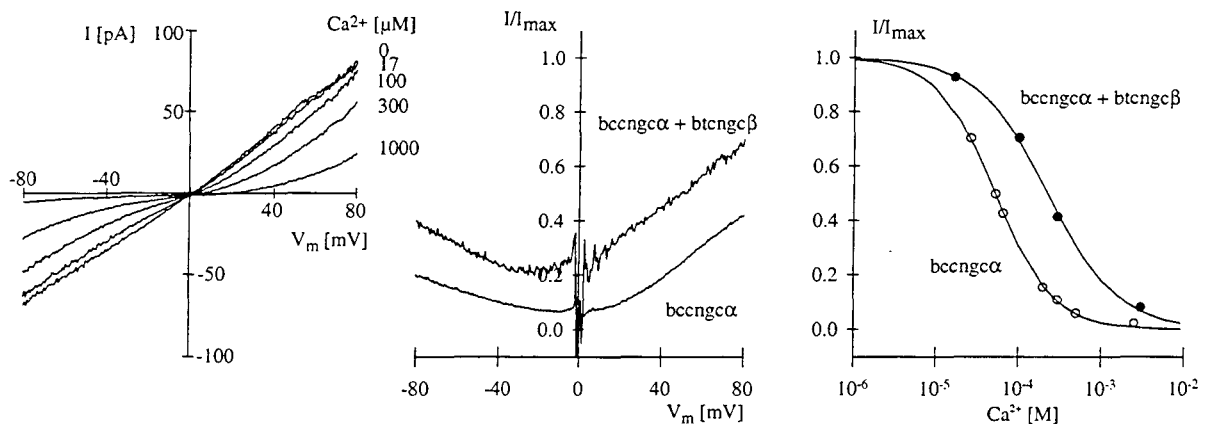


Abb.3.4.2: Blockierung heterooligomerer Kanäle aus bccngc α und btcngc β

Makroskopische Strom-Spannungsbeziehungen (links) des heterooligomeren Kanals in Gegenwart der angegebenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Pipettenlösung enthielt 1 mM cGMP, um die Kanäle zu aktivieren (outside-out Konfiguration). (Mitte): Vergleich der Spannungsabhängigkeit von I/I_{\max} bei 300 μ M $[\text{Ca}^{2+}]_a$ des heterooligomeren Kanals im Vergleich zu bccngc α . (rechts): Dosis-Wirkungskurve (bei -80 mV) für die Ca^{2+} -Blockierung für den heterooligomeren Kanal (●) im Vergleich zum homooligomeren Kanal (○). Die durchgezogene Linie wurde nach der modifizierten Hillgleichung $I/I_{\max} = 1 - c^n / (c^n + K_i^n)$ berechnet mit $K_i = 222.7$ μ M, $n = 1.0$ (Heterooligomer) und $K_i = 51.3$ μ M, $n = 1.2$ (Homooligomer).

Abb.3.4.2 faßt die entsprechenden Ergebnisse für die Koexpression von bccngc α und btcngc β zusammen. Abb.3.4.2 (links) zeigt die I - V_m -Kurven, Abb.3.4.2 (Mitte) vergleicht die Spannungsabhängigkeit von I/I_{\max} (in diesem Fall bei 300 μ M $[\text{Ca}^{2+}]_a$) von dem homooligomeren bccngc α -Kanal mit dem heterooligomeren Kanal, der sich aus bccngc α + btcngc β zusammensetzt. Auch hier ist die geringere Affinität der Bindestelle im heterooligomeren Kanal zu beobachten. Abb.3.4.2 (rechts) verdeutlicht die Abnahme der Blockierungseffizienz für den heterooligomeren Kanal im Vergleich zum homooligomeren Kanal anhand der Dosis-Wirkungskurve bei -80 mV. Der $K_{i,-80\text{mV}}$ -Wert beträgt hier 221 μ M für den heterooligomeren Kanal, im Vergleich zu 66.0 ± 10.9 μ M für den homooligomeren Kanal.

3.4.2 Einfluß der Kanaldichte auf die Blockierung durch $[Ca^{2+}]_a$

Die Blockierungseffizienz durch $[Ca^{2+}]_a$ kann auch durch große Kanaldichten abgeschwächt werden. Dies ist in einer Reihe von Messungen beobachtet worden und könnte durchaus von physiologischer Bedeutung sein. An einem Versuch mit der Chimäre $R_{S5}C_{Po}R$ ist dieser Effekt besonders gut zu erkennen (Abb.3.4.3). Hier wurde an einem patch über einen langen Zeitraum (ca. 7h) die Ca^{2+} -Blockierung untersucht. Ausgangspunkt für diese Langzeituntersuchung war die Beobachtung einer unerwartet schwachen Blockierung durch Ca^{2+} an diesem patch.

Während der langen Meßzeit kam es am patch zu einem sogenannten „rundown“-Phänomen: Der maximale Strom wurde mit der Zeit immer kleiner. Dieses Verhalten ist schon an anderer Stelle beobachtet worden und scheint von der Kanalspezies unabhängig zu sein (Altenhofen, 1994). Man kann diesen Effekt damit erklären, daß die Kanäle mit der Zeit ihre Funktionalität verlieren. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Die Folge ist, daß die Dichte funktioneller Kanäle im patch abnimmt. Betrachtet man I_{max} als relatives Maß für die Dichte von funktionellen Kanälen in der Membran, so spiegelt Abb.3.4.3 (rechts) die Abhängigkeit von I/I_{max} von der Kanaldichte zumindest qualitativ wider.

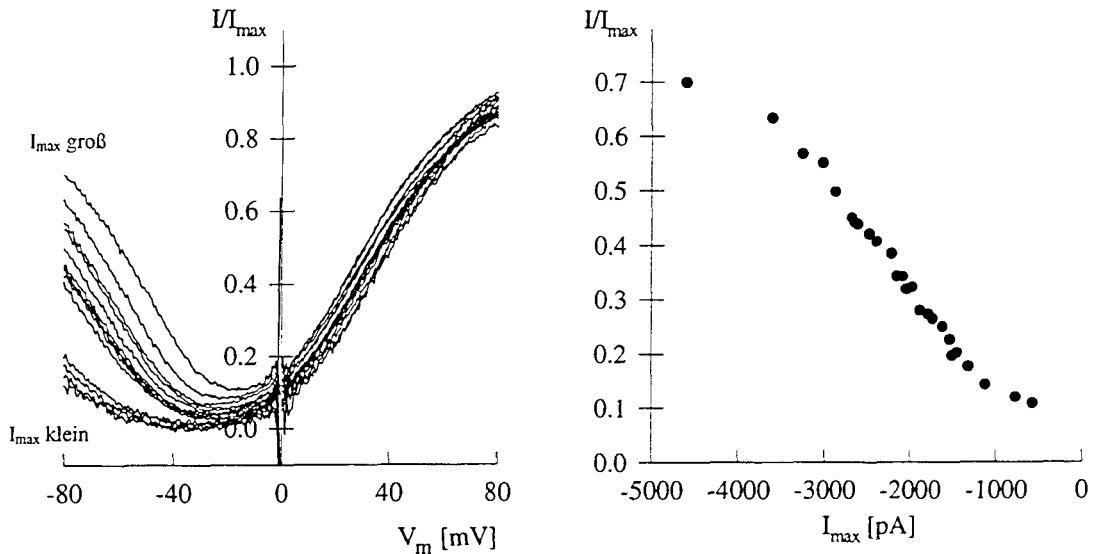


Abb.3.4.3: Einfluß der Kanaldichte. (links): Normierte Ströme der Chimäre $R_{S5}C_{Po}R$ bei einem Versuch, in dessen Verlauf der maximale Strom von ≈ 5 nA auf ≈ 500 pA abnahm. Die Ca^{2+} -Konzentration war $100 \mu M$. Die Kurven mit einer großen Abnahme der Blockierung bei negativen Spannungen entsprechen den großen Werten für I_{max} . (rechts): I/I_{max} -Werte (aus der Abbildung links) nehmen mit der Kanaldichte, reflektiert durch I_{max} immer weiter zu.

Abb.3.4.3 (links) zeigt die sich mit der Kanaldichte verändernden I/I_{\max} - V_m -Kurven. Gerade im negativen Spannungsbereich, wo die Ca^{2+} -Permeation erleichtert wird, sieht man die starke Abweichung der Kurven voneinander. V_c wandert mit abnehmender Kanaldichte immer weiter nach links und die Blockierung wird immer ausgeprägter. Abb.3.4.3 (rechts) zeigt I/I_{\max} Werte (bei -80 mV) in Abhängigkeit von I_{\max} (als relatives Maß für die Kanaldichte). Bei $[\text{Ca}^{2+}]_a = 100 \mu\text{M}$ verändert sich I/I_{\max} von 0.7 bei großen Dichten auf 0.13 bei geringeren Kanaldichten. Eine mögliche Erklärung ist die, daß bei sehr großen Kanaldichten die Diffusion von Ca^{2+} -Ionen vom Medium zu der Kanalöffnung der limitierende Faktor wird. Abb.3.4.4 zeigt schematisch ein Modell, wie die Veränderung der Diffusionsraten zustande kommen könnte: Wenn die Kanaldichte groß ist, könnte sich die Diffusion von Ca^{2+} -Ionen von einem Prozeß mit einer dreidimensionalen Geometrie (Abb.3.4.4, oben) zu einem eindimensionalen Problem (Abb.3.4.4, unten) verändern. Bei sehr hohen Kanaldichten kann es auf der Außenseite der Membran zu Ca^{2+} -Verarmung kommen.

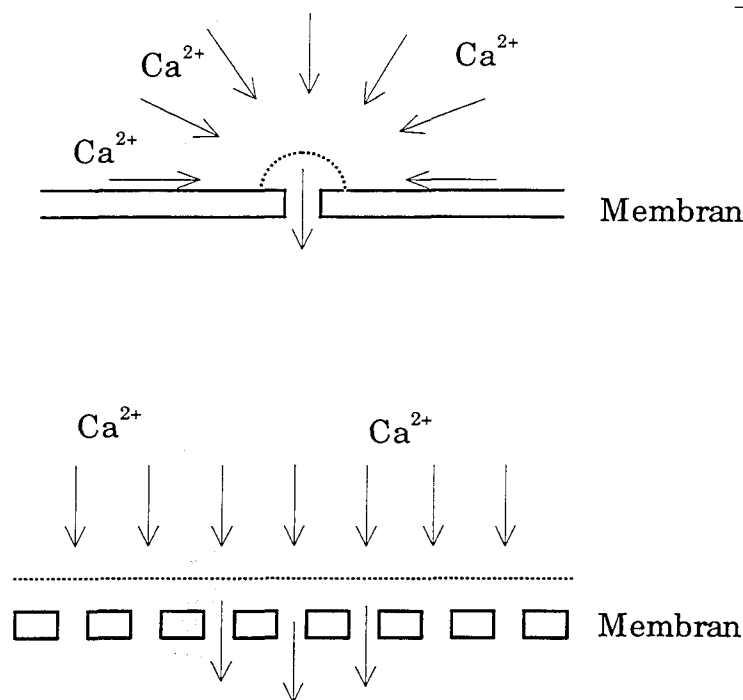


Abb.3.4.4: Schematisches Modell für den Einfluß hoher Kanaldichten. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den „capture“-Bereich des einzelnen Ionenkanals (oben) bzw. einer dichten Kanalpopulation (unten). In diesen „capture“-Bereichen entstehen durch Ionentransport lokale Konzentrationsänderungen. Ein konstanter Fluß von Ionen stellt sich ein, der von der Transportrate des Kanals und von der Diffusionsrate abhängt. Beim Übergang von einer geringen zu einer hohen Kanaldichte ändert sich der Diffusionsfluß zu dem einzelnen Kanal von einer dreidimensionalen (oben) zu einer eindimensionalen Geometrie (unten).

Die Wirkung ist umso ausgeprägter, je größer die Leitfähigkeit eines Kanals ist. Gerade bei Kanälen, die „olf-artig“ sind und beim Kanal aus *Drosophila* ist die Wirkung der hohen Kanaldichte auf die Blockierung gehäuft beobachtet worden. Abb.3.4.3 (rechts) zeigt, daß die Veränderung der Blockierungseigenschaften „schleichend“ vor sich geht. Die Wirkung könnte die relativ große Standardabweichung erklären, die bei den Kanälen, die für Ca^{2+} -Ionen hochpermeabel sind, beobachtet wurde (vergleiche dazu Abb.3.2.2, Abb.3.2.3 und Abb.3.2.5).

3.5 Überlegungen zur Mehrfachbesetzung der cng-Kanalpore mit Ca^{2+} -Ionen

Für Ca^{2+} -Kanäle konnte gezeigt werden, daß im Porenbereich gleichzeitig mehrere Ca^{2+} -Ionen binden können (Hess & Tsien, 1984; Übersicht: Tsien *et al.*, 1987; McCleskey, 1994). Die molekularen Grundlagen hierfür sind in einem Modell zusammengefaßt, das die Permeationseigenschaften dieser Kanäle durch Wechselwirkung von Ionen innerhalb der Pore beschreibt. Die wichtigste Beobachtung, die dieses Modell stützt, ist das sogenannte „anomale Molenbruch-Verhalten“. Dieses Verhalten besagt, daß sich bei Mischungen von verschiedenen unterschiedlich permeablen Ionensorten ein nicht-linearer Zusammenhang des Gesamtstromes von den jeweiligen Ionenmischungen ergibt.

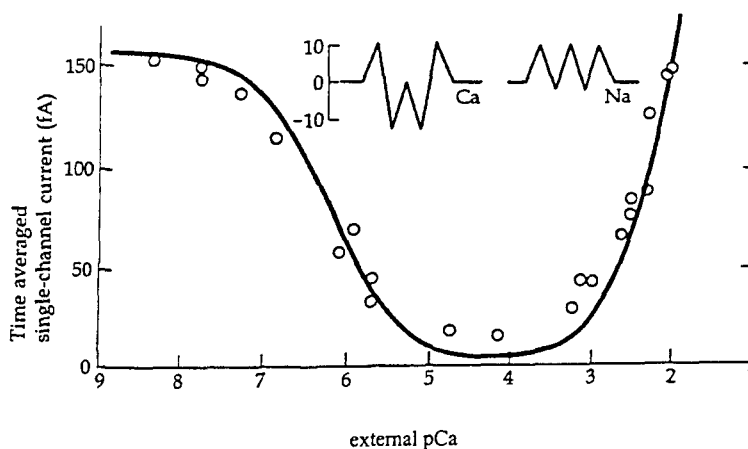


Abb.3.5.1: Ca^{2+} -abhängiger Übergang von einer hohen Na^{+} -Leitfähigkeit zu einer hohen Ca^{2+} -Leitfähigkeit in Ca^{2+} -Kanälen (Erklärung siehe Text). Abbildung aus Hille, 1992.

Abb.3.5.1 faßt dieses Verhalten zusammen. Hier sind die Permeabilitätsänderungen von Ca^{2+} -Kanälen von einer hohen Na^+ -Permeabilität zu einer hohen Ca^{2+} -Permeabilität in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dargestellt. Bei den kleinsten Ca^{2+} -Konzentrationen ($\approx 7 \text{ nM}$) wird der Einwärtsstrom von Na^+ -Ionen getragen. Wenn man die $[\text{Ca}^{2+}]$ erhöht, wird der Na^+ -Strom blockiert, da Ca^{2+} an eine hochaffine Bindestelle in der Pore bindet. Bei millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen steigt der Strom dann wieder an und wird durch Ca^{2+} -Ionen anstelle von Na^+ -Ionen getragen. Man erklärt den Wiederanstieg des Stromes dadurch, daß bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen die Pore wahrscheinlich von zwei Ca^{2+} -Ionen besetzt ist und daß die Doppelbesetzung aufgrund von elektrostatischer Wechselwirkung zwischen den Ionen zu einer starken Reduktion der Bindungsaffinität führt. Die Dissoziation von der Bindestelle wird dadurch erleichtert und führt zu den beobachteten großen Ca^{2+} -Strömen.

Für cng-Kanäle gibt es Hinweise für ein ähnliches Verhalten mit monovalenten Kationen (Sesti *et al.*, 1995). Ob cng-Kanäle gleichzeitig zwei Ca^{2+} -Ionen in der Pore binden können, ist nicht bekannt. Ein Wiederanstieg des Stromes bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen bei ähnlichen Messungen wie in Abb.3.5.1 konnte in cng-Kanälen nicht beobachtet werden. Es ist jedoch denkbar, daß sich cng-Kanäle im Prinzip so verhalten wie Ca^{2+} -Kanäle und daß es nur quantitative Unterschiede zwischen den beiden Kanalfamilien gibt. Die folgenden Überlegungen diskutieren die Möglichkeiten der Mehrfachbesetzung der cng-Kanalpore mit zwei Ca^{2+} -Ionen.

Für cng-Kanäle existieren Messungen über die Ca^{2+} -Abhängigkeit des sogenannten „fraktionalen Ca^{2+} -Stromes“ P_f (Neher & Augustine, 1992; Schneggenburger *et al.*, 1993; Frings *et al.*, 1995), das ist der Anteil des Gesamtstromes, der von Ca^{2+} -Ionen getragen wird. Man erhält diese Werte, indem man an ganzen Zellen gleichzeitig den Gesamtstrom über „whole-cell“ Messungen und den Ca^{2+} -Einstrom über Fluoreszenzmessungen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff FURA II bestimmt.

Abb.3.5.2 vergleicht die Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f für $\text{bccng}\alpha$ (Abb.3.5.2 (•), Daten wurden freundlicherweise von C. Dzeja zur Verfügung gestellt) mit den nach dem Goldman-Hodgkin-Katz-(GHK)-Formalismus (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949) berechneten Werten (Abb.3.5.2, gestrichelte Linie):

$$P_f = \frac{4[Ca^{2+}]_a}{4[Ca^{2+}]_a + \frac{P_K}{P_{Ca}}[K^+]\{1 - \exp(\frac{2FV_m}{RT})\}} \quad (7)$$

Es fällt auf, daß nur für die kleinsten verwendeten Ca^{2+} -Konzentrationen die Meßwerte mit der theoretischen Kurve übereinstimmen. Bei größeren Ca^{2+} -Konzentrationen liegen die gemessenen Daten deutlich über den vorhergesagten Werten.

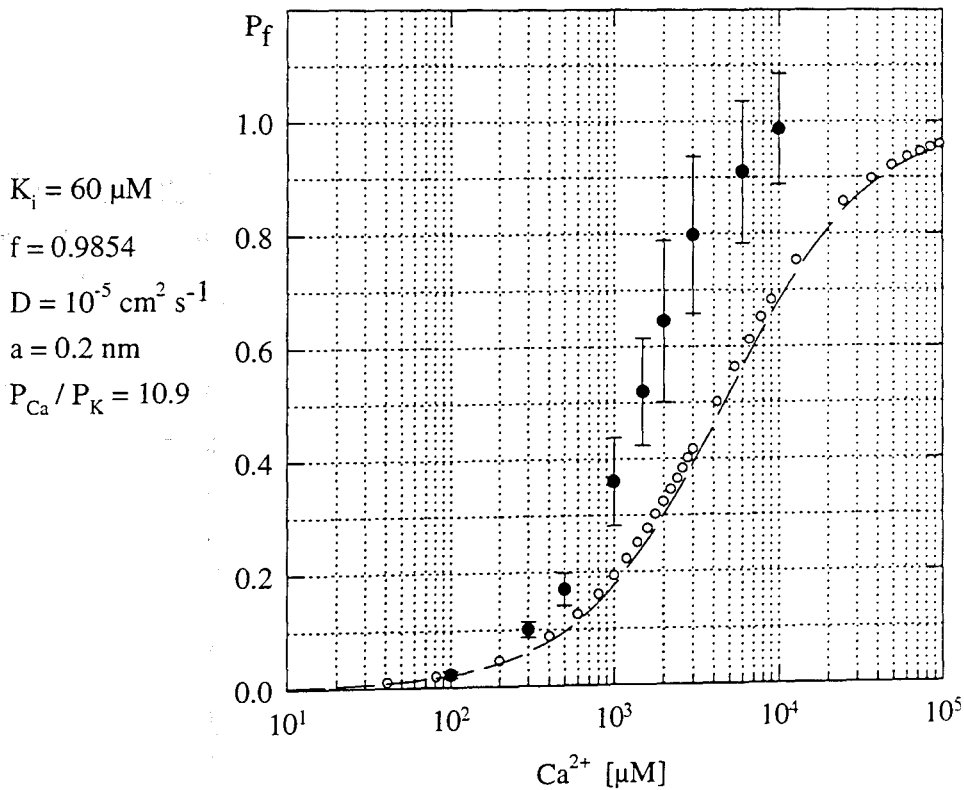


Abb.3.5.2: Vergleich der gemessenen Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f (•) mit der Berechnung nach GHK (Gl(7)) (gestrichene Linie) und nach Gl(12) (o). Die Parameter für die Berechnung sind links neben der Abbildung angegeben (Daten von C. Dzeja).

Es soll an dieser Stelle versucht werden, eine zum GHK-Formalismus alternative Beschreibung für die Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f zu finden, wobei weniger auf eine rigorose Ableitung der Gleichungen, als auf den möglichen Mechanismus der Ionenwechselwirkung in der Pore Wert gelegt wurde.

Zunächst soll versucht werden, eine empirische Beschreibung für P_f -Werte zu bekommen, die auf den bekannten Eigenschaften der Wechselwirkung von Ca^{2+} -Ionen mit cng-Kanälen beruht und die keine Mehrfachbesetzung der Pore vorsieht.

Im zweiten Schritt wird versucht, die gewonnenen Gleichungen so abzuwandeln, daß sich auch für den Gesamtstrom in cng-Kanälen ein anomales Molenbruchverhalten ergibt. Mit diesen Gleichungen wird dann P_f berechnet.

Wenn die Pore nur ein Ca^{2+} -Ion binden kann, so wird sich bei einer gegebenen Ca^{2+} -Konzentration ein Ca^{2+} -Einstrom einstellen, der nur von der Besetzungswahrscheinlichkeit bzw. von der Aufenthaltsdauer des Ca^{2+} -Ions abhängt. Die Blockierungskonstante K_i ist ein Maß für diese Parameter: Je kleiner K_i , desto länger ist die Aufenthaltszeit eines Ca^{2+} -Ions an der Bindestelle und desto größer ist die Besetzungswahrscheinlichkeit der Bindestelle. Der Ca^{2+} -Strom, der sich so ergibt, kann durch die Diffusionsraten von Ca^{2+} -Ionen zur Kanalpore beschrieben werden (Hille, 1992), gewichtet mit der Wahrscheinlichkeit p , daß die Bindestelle nicht mit Ca^{2+} -Ionen besetzt ist.

$$p = \frac{I}{I_{\max}} = \frac{K_i^n}{K_i^n + c^n} = \frac{K_i}{K_i + c} \quad (\text{da } n = 1) \quad (8)$$

mit K_i : Blockierungskonstante, c : Ca^{2+} -Konzentration

Die Anzahl N_{Ca} der transportierten Ca^{2+} -Ionen pro Zeiteinheit (als Funktion von c) ist dann:

$$N_{\text{Ca}}(c) = 2\pi a D c \frac{K_i}{K_i + c} \quad (9)$$

mit a : Radius des Porenmundes, D : Diffusionskoeffizient.

Der Gesamtstrom durch cng-Kanäle wird durch Ca^{2+} -Ionen blockiert. Ist die Ca^{2+} -Konzentration sehr hoch, wird die Bindestelle praktisch immer mit Ca^{2+} -Ionen besetzt sein. Unter diesen Bedingungen sollte ein konstanter von Ca^{2+} -Ionen getragener Strom fließen.

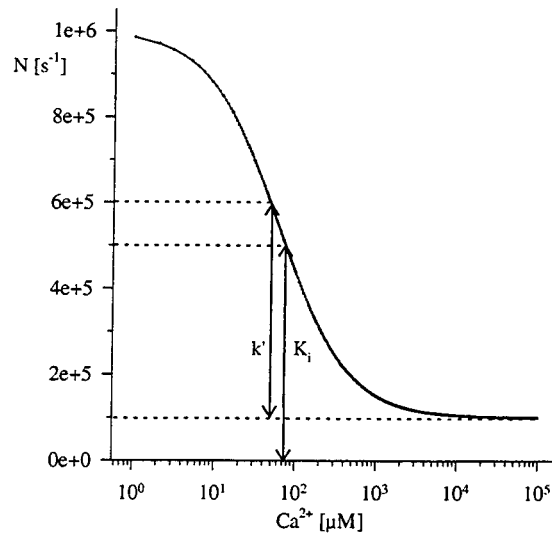


Abb.3.5.3: Verlauf der transportierten Gesamtladungen N in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration unter der Annahme, daß Mehrfachbesetzung mit zwei Ca^{2+} -Ionen nicht stattfindet (nach Gl(10)). Die gestrichelte Linie unten deutet den konstanten Grenzwert bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen an. k' ist die Konstante für halbmaximale Blockierung unter Berücksichtigung des Grenzwertes.

Der Verlauf der Kurve in Abb.3.5.3 verdeutlicht diese Verhältnisse. Hier ist der Gesamtstrom durch die Kanäle auf die Gesamtzahl der transportierten Ladungen N pro Zeiteinheit umgerechnet worden. Die gestrichelte Linie deutet den konstanten Grenzwert ($\neq 0$) bei großen Ca^{2+} -Konzentrationen an. Gl (10) beschreibt die Gesamtzahl N der transportierten Ladungen pro Zeiteinheit als Funktion von c :

$$N(c) = \frac{i_0}{e_0} \left\{ 1 - f\left(\frac{c}{c + k'}\right) \right\} \quad (10)$$

mit i_0 : Einzelkanalstrom in Ca^{2+} -freiem Medium, e_0 : Elementarladung. f bezeichnet den maximal blockierten Anteil des Gesamtstromes. k' ist die Konstante für halbmaximale Blockierung des Gesamtstromes (siehe Abb.3.5.3). k' hängt mit K_i zusammen über:

$$k' = K_i (2f - 1) \quad (11)$$

Man kann nun mit Gl(9) und Gl(10) P_f berechnen:

$$P_f = \frac{2N_{Ca}}{N} = \frac{4\pi a D c \frac{K_i}{K_i + c}}{\frac{i_0}{e_0} \{1 - f(\frac{c}{c + k'})\}} \quad (12)$$

Der Faktor 2 im Zähler der Gleichung berücksichtigt die zwei Ladungen für jedes Ca^{2+} -Ion. Abb.3.5.2 vergleicht die nach Gleichung (12) berechneten P_f -Werte (o) mit den entsprechenden Werten, die nach GHK (gestrichelte Linie) berechnet wurden. Links neben der Abb.3.5.2 sind die verwendeten Parameter angegeben, die für die Berechnung verwendet wurden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der Gleichung (12) mit dem GHK-Modell (Gleichung (7)) ist recht gut. Die steile Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f wird jedoch mit beiden Gleichungen nicht zufriedenstellend beschrieben.

Die so gewonnenen Gleichungen sollen so geändert werden, daß sich ein Gesamtstromverlauf wie in Ca^{2+} -Kanälen ergibt: Die Annahme ist, daß es eine zweite Bindestelle mit Bindekonstante k'' in der Pore von cng-Kanälen gibt. Die Wahrscheinlichkeit p' , daß diese zweite hypothetische Bindestelle nicht besetzt ist, ist gegeben durch

$$p' = \frac{k''}{k'' + c} \quad (13)$$

Berücksichtigt man noch die Besetzungswahrscheinlichkeit der ersten Bindestelle $c / (c + K_i)$, so ergibt sich für den Beitrag der Ionenwechselwirkung die zusätzliche Anzahl an transportierten Ladungen pro Zeiteinheit:

$$N'(c) = 4\pi a D c \left(\frac{c}{K_i + c} \right) \left(\frac{k''}{k'' + c} \right) \Psi \quad (14)$$

Ψ ist ein Faktor zwischen 0 und 1, der beinhaltet, daß bei Doppelbesetzung in der Pore ein Ca^{2+} -Ion auch zurück nach außen wandern kann und nicht zum Gesamtstrom beiträgt. Die Besetzungswahrscheinlichkeit $c / (K_i + c)$ der ersten Bindestelle geht deswegen ein, weil wir annehmen, daß die Bindestellen nicht unabhängig sind (die zweite Bindestelle kann nur dann besetzt werden, wenn die erste schon besetzt ist, sonst wird diese nämlich besetzt).

(durchgezogene Linie). Die Parameter für die Gleichungen GHK=Gl(7), Gl(12) und Gl(16) sind links neben der Abb.3.5.5 angegeben.

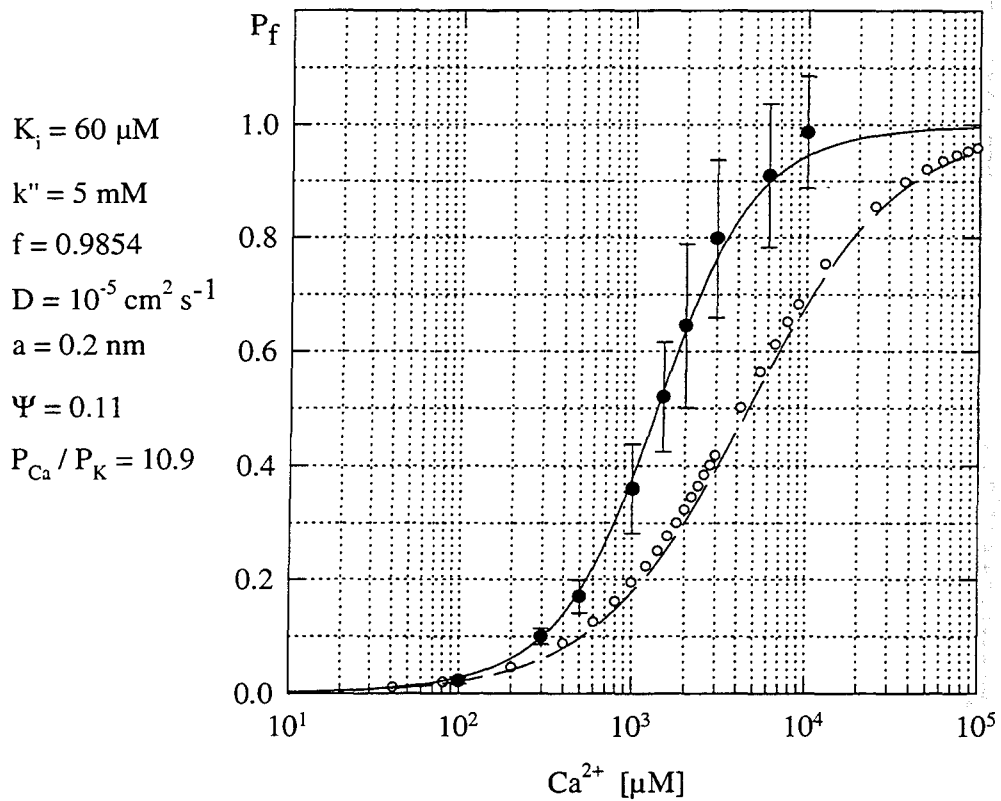


Abb.3.5.5: Vergleich der gemessenen Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f (●) mit der Berechnung nach GHK (Gl(7)) (gestrichelte Linie) und nach Gl(12) (o), und nach Gl(16) (durchgezogene Linie). Die Parameter für die Berechnung sind links neben der Abbildung angegeben (Daten von C. Dzeja).

Gl (16) liefert mit dem angegebenen Parametersatz eine exzellente Übereinstimmung der errechneten P_f -Kurve mit den gemessenen Werten. Mit denselben Parametern gibt es für die einfachere Gl(12) eine gute Übereinstimmung mit GHK. Die Übereinstimmung der gemessenen Daten mit Gl(16) zeigt, daß die Annahme eines „anormalen Molenbruch-Verhaltens“ in cng-Kanälen sinnvoll erscheint. Es ist nicht klar, ob Gl(16) wirklich die Konsequenzen der Ionenwechselwirkung in der Pore widerspiegelt. Die Gleichung (16) enthält Annahmen (k'' , Ψ), für die es bisher keine Beweise gibt. Es wurde im wesentlichen

versucht, das bei Ca^{2+} -Kanälen gefundene Verhalten des Gesamtstroms zu simulieren und auf die Verhältnisse in cng-Kanälen zu übertragen.

Die gute Übereinstimmung der mit Gleichung (16) berechneten Werte mit den Meßergebnissen weist auf Mehrfachbesetzung der cng-Kanalpore mit Ca^{2+} -Ionen hin und verdeutlicht die enge Verwandtschaft dieser beiden Kanalfamilien.

4 Diskussion

4.1 Ca^{2+} -Blockierung verschiedener cng-Kanäle

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen $[\text{Ca}^{2+}]_a$ mit verschiedenen cng-Kanälen untersucht. Hierbei diente insbesondere die Blockierung des von Na^+ - oder K^+ -Ionen getragenen Stromes durch $[\text{Ca}^{2+}]_a$ als Maß für die Stärke der Wechselwirkung. Für die α -Untereinheit aus Sehtäbchen (*brncg α*) gab es hierzu schon Untersuchungen (Eismann *et al.*, 1994; Park & MacKinnon, 1995).

So fanden Eismann *et al.* (1994) eine mittlere Blockierungskonstante von $3.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$ (-80 mV), Park und MacKinnon (1995) jedoch einen Wert von $0.38 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (+30 mV). In beiden Untersuchungen wurde über eine steile Dosis-Wirkungsbeziehung mit Hillkoeffizienten von $n = 2.3$ (Eismann *et al.*, 1994) bzw. $n = 2.7$ (Park & MacKinnon, 1995) berichtet. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Untersuchungen an *brncg α* wiederholt, um diesen Kanal mit den anderen α -Untereinheiten unter identischen Bedingungen vergleichen zu können. Die gefundenen Blockierungskonstanten liegen mit $7.4 \pm 2.5 \mu\text{M}$ (-80 mV) in der Größenordnung der Resultate von Eismann *et al.* (1994). Der Mittelwert für K_i bei +30 mV war $37.0 \pm 11 \mu\text{M}$. Kooperativität wurde bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet (siehe Abb.3.1.4, rechts).

Die Ergebnisse von Park & MacKinnon (1995), nämlich eine um den Faktor 100 kleinere Ca^{2+} -Konzentration für halbmaximale Blockierung (bei +30 mV) sowie der hohe Wert für den Hillkoeffizienten, lassen sich nur durch ungenaue Ca^{2+} -Konzentrationsberechnung der Testlösungen erklären (siehe auch Abschnitt 2.4). Auch im Laufe meiner Arbeit wurde festgestellt, daß man mit berechneten Ca^{2+} / EGTA-Mischungen nicht immer zuverlässig definierte freie Ca^{2+} -Konzentrationen erhält. Der Hauptgrund hierfür scheint die ungenaue Angabe bezüglich der Reinheit von Ca^{2+} -Puffersalzen zu sein (Bers, 1982; Bers *et al.*, 1994). Die ungenaue Einstellung der freien Ca^{2+} -Konzentrationen führte auch in dieser Arbeit gelegentlich zu Auswertungen, die einen steilen Dosis-Wirkungsverlauf der Ca^{2+} -Blockierung vortäuschten. Die nachträgliche Überprüfung der entsprechenden Meßlösungen mit geeichten Ca^{2+} -Elektroden bzw. mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Arsenazo III ergab aber dann immer Kurvenverläufe, die einem einfachen Bindungsmodell entsprachen.

Die Ca^{2+} -Blockierung wurde bei verschiedenen α -Untereinheiten verglichen. Besonders die Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit der Blockierungskonstanten deuten auf sehr unterschiedliche Ca^{2+} -Leitfähigkeiten der einzelnen cng-Kanäle hin. Die Spannungsabhängigkeiten von I/I_{\max} und K_i spiegeln den typischen Verlauf der Blockierung durch ein geladenes, permeierendes Ion wider (Woodhull, 1973; Hille, 1992): Das blockierende Ion bindet im Porenbereich innerhalb der Membran und verhindert während seiner Aufenthaltszeit, daß andere Ionen fließen können. Besitzt das blockierende Ion genügend Energie, um die Bindungsenergie an der Bindestelle zu überwinden, dissoziiert es von der Bindestelle ab und der Kanal ist wieder frei für den Transport anderer Ionen. Durch Variation der Membranspannung V_m wird die Energie des Ions und somit seine Aufenthaltszeit an der Bindestelle verändert. Ein permeierendes Ion zeigt bei großen V_m -Werten, also bei großen Energien, kurze Aufenthaltszeiten und somit eine geringere Blockierungseffizienz (Woodhull, 1973; Hille, 1992).

Ein Vergleich der Blockierungskonstanten (K_i) bei einer definierten negativen Spannung zusammen mit der Membranspannung (V_c), bei der K_i den jeweils kleinsten Wert zeigt, erlaubt eine qualitative Abschätzung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit der verschiedenen cng-Kanäle: brcng α besitzt die geringste Ca^{2+} -Leitfähigkeit, gefolgt von bccng α und bocng α .

Für eine zusätzliche Analyse wurde ein Barrierenmodell (nach Woodhull, 1973) mit einer Bindestelle und zwei Barrieren entwickelt, mit dem die I/I_{\max} -Kurven für brcng α , bccng α und bocng α beschrieben werden konnten. Aus diesem Modell wurde für die unterschiedlichen Ca^{2+} -Leitfähigkeiten eine etwas andere Reihenfolge abgeleitet: Die Ca^{2+} -Leitfähigkeit (bei 0 mV) von brcng α ist am geringsten, jedoch scheint bccng α etwas permeabler für Ca^{2+} zu sein als bocng α . Der Unterschied zu den Werten, die man aus der Spannungsabhängigkeit von K_i ableitet, könnte darin liegen, daß man die Permeabilitäten bei unterschiedlichen Spannungen vergleicht: für große negative V_m -Werte (Spannungsabhängigkeit) und bei 0 mV (Barrierenmodell). Es ist durchaus denkbar, daß bocng α bei kleinen negativen V_m -Werten weniger Ca^{2+} transportiert als bccng α , bei größeren Spannungen jedoch mehr. Unterstützt wird diese Interpretation durch Ergebnisse von Messungen der relativen Permeabilitäten: So findet Godde (1996) für die relative Permeabilität $P_{\text{Ca}} / P_{\text{K}}$, gemessen unter biionischen Bedingungen (bei $V_m = -25$ mV bis -5 mV), Werte von 3.1 für brcng α , 6.8 für bocng α und 10.9 für bccng α . Diese Sequenz entspricht in der Reihenfolge der Abschätzung nach dem Barrierenmodell.

Bei den gleichen Experimenten wurden auch die relativen Leitfähigkeiten g_{Ca}/g_K ausgewertet. Da Ca^{2+} bei diesen Messungen auf der Innenseite der Membran vorlag, mußten die relativen Leitfähigkeiten bei positiven Spannungen (+60 mV) verglichen werden. Die Auswertung ergab folgende Werte:

g_{Ca}/g_K ist 0.013 für $brngc\alpha$, 0.039 für $bccngc\alpha$ und 0.089 für $bocngc\alpha$ (Godde, persönliche Mitteilung). Hiernach ist bei größeren Spannungen $bocngc\alpha$ der Kanal mit der größten Leitfähigkeit, gefolgt von $bccngc\alpha$ und $brngc\alpha$, ähnlich wie die Reihenfolge aus der Spannungsabhängigkeit der Blockierung. Alle Abschätzungen verdeutlichen die viel geringere Ca^{2+} -Leitfähigkeit von $brngc\alpha$ im Vergleich zu $bccngc\alpha$ und $bocngc\alpha$, während die relativ geringen Unterschiede zwischen $bccngc\alpha$ und $bocngc\alpha$ wohl spannungsabhängig sind.

4.2 Molekulare Ursachen

Die Untersuchung der molekularen Ursachen für die unterschiedliche Ca^{2+} -Permeabilität stellte sich als schwieriger heraus als zunächst angenommen. Die hohe Sequenzähnlichkeit im Porenbereich zusammen mit den Ergebnissen der Mutationsstudien an $dmcngc\alpha$ schlossen nämlich aus, daß Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Porenregion für die unterschiedliche Wechselwirkung von cng-Kanälen mit $[Ca^{2+}]_a$ bestimmend sind.

Die Chimären zwischen $brngc\alpha$ und $bocngc\alpha$, sowie zwischen $brngc\alpha$ und $bccngc\alpha$ zeigten, daß der gesamte Bereich S_5 , Pore und S_6 (S_5 -P- S_6) die spezifische Ca^{2+} -Wechselwirkung eines jeden Kanals bestimmt. Weder der N-Terminus, noch die transmembranalen Segmente S_1 - S_4 oder der C-Terminus haben einen Einfluß auf die Ca^{2+} -Blockierungseigenschaften von cng-Kanälen. Innerhalb der Region S_5 -P- S_6 scheinen jedoch diverse Aminosäuren Einfluß auf die Permeationseigenschaften zu haben. Die verschiedenen Einflüsse einzelner funktioneller Gruppen scheinen sich zu überlagern und die funktionellen Unterschiede der verschiedenen cng-Kanäle zu bewirken. Eine der Wirkungen von S_5 -P- S_6 betrifft das Protonierungsmuster innerhalb der Pore. Root & MacKinnon (1994) haben gezeigt, daß sich innerhalb der Pore des cng-Kanals vom olfaktorischen Gewebe des Katzenwelses zwei unterschiedliche protonierbare Gruppen befinden, die wahrscheinlich von den Glutaminsäuren in der Pore gebildet werden. Beide

Gruppen haben einen pK_a von 7.6. Die Resultate meiner Arbeit weisen darauf hin, daß zumindest in $bcn\alpha$ und $bocn\alpha$ ebenfalls mehrere pH-abhängige Gruppen in der Pore existieren. Die Titrationskurven in diesen Kanälen deuten jedoch an, daß diese Gruppen unterschiedliche pK_a -Werte besitzen. Das voneinander abweichende Protonierungsmuster der cng -Kanäle könnte zumindest einen Teil der unterschiedlichen Ca^{2+} -Wechselwirkung erklären. Zusätzlich zur Protonierung ist aber nicht auszuschließen, daß auch die räumliche Anordnung der Bindestelle durch die kanalspezifische Struktur S_5 -P- S_6 beeinflußt und dadurch die Ca^{2+} -Bindung moduliert wird.

Die Beobachtung, daß Bereiche außerhalb S_5 -P- S_6 keinen Einfluß auf die Permeationseigenschaften besitzen, unterstützt ein kürzlich entwickeltes Modell über die Evolution von Ionenkanälen (Torre *et al.*, 1992; Nichols, 1993; Jan & Jan, 1994; Ranganathan, 1994). Demzufolge bestanden Untereinheiten von Ionenkanälen ursprünglich aus einer Porenregion, die von zwei transmembranalen Segmenten umgeben war (Jan & Jan, 1994). Wahrscheinlich bildeten vier dieser Polypeptide die eigentliche Pore aus („inner core“, Nichols, 1993; Jan & Jan, 1994). Kanäle mit Spannungsabhängigkeit und Inaktivierungsmechanismen entwickelten sich aus diesen „Ur-Kanälen“ durch Hinzufügen weiterer funktioneller Bereiche (Jan & Jan, 1994).

Spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle entstanden aus bereits bestehenden Ionenkanälen wahrscheinlich durch Genduplikation (Hille, 1992; Strong *et al.*, 1993). Diese Kanäle haben vier interne Wiederholungen, die sich wahrscheinlich durch zwei aufeinanderfolgende Genduplikationen entwickelt haben (Strong *et al.*, 1993). Kürzlich wurde in Hefe ein K^+ -Kanal gefunden, der zwei Porenregionen besitzt und der N-terminal den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen ähnelt, C-terminal aber eine hohe Homologie zu einem einwärts-gerichteten K^+ -Kanal hat (Ketchum *et al.*, 1995). In all diesen Ionenkanälen ist die „inner core“-Struktur erhalten geblieben (Nichols, 1993; siehe auch MacKinnon, 1995). Untersuchungen an K^+ -Kanälen deuten übereinstimmend mit den hier gefundenen Ergebnissen an, daß Ionenselektivität und Permeationseigenschaften im wesentlichen durch diesen „inner core“-Bereich (S_5 -P- S_6) bestimmt werden (Nichols, 1993). So wurde für K^+ -Kanäle gezeigt, daß an verschiedenen Stellen innerhalb des S_6 -Segmentes Aminosäureaustausche die Poreneigenschaften beeinflussen (Lopez *et al.*, 1994). Außerdem hat in diesen Kanälen die Aminosäureschleife zwischen S_4 und S_5 einen Anteil an der Ausbildung der Ionenselektivität (Slesinger *et al.*, 1993).

4.3 Sind cng-Kanäle und Ca^{2+} -Kanäle evolutionär verwandt ?

Ca^{2+} spielt in der Signaltransduktion und Adaptation von Zellen eine entscheidende Rolle. Die verschiedenen Möglichkeiten, wie Ca^{2+} von außen in die Zelle gelangen kann, sind daher von großer Bedeutung. Neben spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen hat man die Gruppe der nichtselektiven Kationenkanäle als wichtige Quelle für den Ca^{2+} -Einstrom erkannt. Zu dieser Familie von Kanalproteinen gehören neben den cng-Kanälen insbesondere einige Neurotransmitter-gesteuerte Rezeptorkanäle in Nervenzellen. Messungen des Ca^{2+} -Anteils am Gesamtstrom, P_f , wurden an verschiedenen Glutamaterezeptoren (vom NMDA- bzw. vom AMPA / Kainat-Typ), sowie am nikotinischen ACh-Rezeptor durchgeführt. Bei 2-3 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ war der Anteil des Ca^{2+} -Stromes am Gesamtstrom in diesen Rezeptoren in der Größenordnung von 1.4% - 6.8% (Schneggenburger *et al.*, 1993; Trouslard *et al.*, 1993; Zhou & Neher, 1993; Vernino *et al.*, 1994). Im Falle des nikotinischen ACh-Rezeptors wurde zusätzlich die Ca^{2+} -Abhängigkeit bestimmt: Die P_f -Werte steigen linear auf bis zu 3% - 6% bei 5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ und scheinen in diesem Bereich noch nicht gesättigt zu sein. Der Strom monovalenter Kationen durch diese Kanäle wird dabei nur wenig blockiert.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit von P_f in cng-Kanälen ist dagegen sehr stark ausgeprägt. Die Steigung der Kurve (Abb.3.5.5) weist auf Mehrfachbesetzung mit Ca^{2+} -Ionen hin. Bei 5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$ beträgt P_f für *bccngcα* schon ca. 90% und erreicht 100% bei ca. 10 mM $[\text{Ca}^{2+}]_a$. Gleichzeitig wird der Strom monovalenter Kationen stark blockiert.

In diesen Eigenschaften unterscheiden sich die untersuchten Neurotransmitterkanäle und cng-Kanäle sehr. Dagegen scheinen Mechanismus und strukturelle Grundlagen für Ca^{2+} -Selektivität und Ca^{2+} -Permeation von cng-Kanälen und Ca^{2+} -Kanälen viel besser übereinzustimmen: Nach einem weithin anerkannten Modell für Ca^{2+} -Kanäle (Übersicht: McCleskey, 1994; Sather *et al.*, 1994) entsteht Ca^{2+} -Selektivität dadurch, daß Ca^{2+} -Ionen an eine hochaffine Bindestelle im Porenbereich des Kanals binden. Diese Bindestelle wird aus vier Glutaminsäureresten gebildet. Solange Ca^{2+} diese Bindestelle besetzt, verhindert es die Permeation monovalenter Kationen. Signifikante Ca^{2+} -Ströme entstehen erst bei millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen. Man erklärt dies dadurch, daß die Bindestelle gleichzeitig zwei Ca^{2+} -Ionen binden kann, die sich gegenseitig abstoßen. Bei millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit für eine Mehrfachbesetzung der

Bindestelle recht hoch, die Affinität und damit die Aufenthaltszeit eines Ca^{2+} -Ions wird so verringert. Dies führt zu den beobachteten großen Ca^{2+} -Strömen.

Folgende Übereinstimmungen findet man zwischen homooligomeren cng-Kanälen und Ca^{2+} -Kanälen:

- In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} sind sowohl Ca^{2+} -Kanäle als auch cng-Kanäle wenig selektiv und leiten sehr gut monovalente Ionen (Übersicht: Sather *et al.*, 1994; Torre & Menini, 1994).
- Mikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen blockieren den Strom, der durch monovalente Kationen getragen wird, in beiden Kanalfamilien. Hierbei sind die gemessenen Blockierungskonstanten K_i in Ca^{2+} -Kanälen etwas kleiner ($1\mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_a$) als die der verschiedenen cng-Kanäle ($5\text{-}200\mu\text{M}$). Sowohl in cng-Kanälen als auch in Ca^{2+} -Kanälen folgt die Blockierung einem einfachen Bindungsmodell (Hillkoeffizienten $n \approx 1$) (Kim *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Baumann *et al.*, 1994; Eismann *et al.*, 1994; Frings *et al.*, 1995; Körschen *et al.*, 1995).
- Mutagenesestudien konnten für beide Kanalfamilien zeigen, daß die Bindestelle für die Blockierung durch eine Gruppe von Glutaminsäureresten gebildet wird, die im Porenbereich der Proteine liegt (Kim *et al.*, 1993; Root & MacKinnon, 1993; Yang *et al.*, 1993; Eismann *et al.*, 1994).
- Bei genügend großen Ca^{2+} -Konzentrationen leiten cng-Kanäle genau wie Ca^{2+} -Kanäle ausschließlich Ca^{2+} -Ionen (Frings *et al.*, 1995).
- Für Ca^{2+} -Kanäle schließt man aus dem „anormalen Molenbruch-Verhalten“, daß sich gleichzeitig mehrere Ca^{2+} -Ionen in der Pore aufhalten können (Hess & Tsien, 1984, Übersicht: Tsien *et al.*, 1987; McCleskey, 1994). Auch andere Untersuchungen an Ca^{2+} -Kanälen deuten Mehrfachbesetzung der Pore an (Kuo & Hess, 1993a, b). Für cng-Kanäle wurde über ein „anomalies Molenbruch-Verhalten“ bei verschiedenen Mischungen monovalenter Kationen berichtet (Sesti *et al.*, 1995). Die steile Abhängigkeit des P_r -Wertes von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Frings *et al.*, 1995) weist ebenfalls auf Mehrfachbesetzung der cng-Kanalpore mit Ca^{2+} -Ionen hin.

In diesen funktionellen Aspekten stimmen die beiden Kanalfamilien sehr stark überein. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen auch die physiologische Bedeutung und die Klassifizierung von cng-Kanälen neu überdacht werden. Wenn α -Untereinheiten von cng-Kanälen bei millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen, d.h. bei physiologischen Bedingungen,

ausschließlich Ca^{2+} -Ionen leiten, könnte man sie eher als liganden-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle betrachten. Es erscheint mir eine wichtige Fragestellung, herauszufinden, ob es tatsächlich homooligomere cng-Kanäle *in situ* gibt, wo diese exprimiert werden, und welche Funktion sie schließlich haben.

4.4 Einfluß der β -Untereinheiten auf die Ca^{2+} -Blockierung

Extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen blockieren heterooligomere Kanäle aus brcngc α und brcngc β sowie aus bccngc α und btcngc β weniger stark als die entsprechenden homooligomeren Kanäle brcngc α und bccngc α .

Ein Glyzin in der Porenregion der β -Untereinheiten anstelle einer Glutaminsäure, die sich an der entsprechenden Stelle in den α -Untereinheiten befindet, könnte für die reduzierte Affinität der Ca^{2+} -Bindestelle in der Pore und damit für die reduzierte Blockierung der heterooligomeren Kanäle verantwortlich sein.

Eine geringere Ca^{2+} -Blockierbarkeit bedeutet, daß unter gleichen Bedingungen mehr Na^{+} -Ionen durch diese Kanäle fließen können. Das kann für die Erregung von Nervenzellen bedeutend sein, weil durch die resultierende Depolarisation Aktionspotentiale ausgelöst werden können. Mit dem größeren Na^{+} -Einstrom scheint aber gleichzeitig ein größerer Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verbunden, da die reduzierte Blockierung kürzere Aufenthaltszeiten von Ca^{2+} in der Pore widerspiegelt.

4.5 Modulation der Funktion von cng-Kanälen auf zellulärem Niveau:

Die Kanaldichte verändert die Ca^{2+} -Wechselwirkung

Werden cng-Kanäle in sehr hoher Dichte exprimiert, können bei starker Aktivierung so viele Ca^{2+} -Ionen durch die Kanäle fließen, daß $[\text{Ca}^{2+}]_a$ nahe der Membran beträchtlich sinkt (Abb.3.4.3). Durch die erniedrigte Ca^{2+} -Konzentration werden die cng-Kanäle weniger effektiv blockiert. Infolgedessen können auch Na^{+} -Ionen vermehrt in die Zelle strömen und sie depolarisieren. Eine hohe Kanaldichte ist allerdings für die Zelle auch riskant, da so viel Ca^{2+} einströmen kann, daß die Ca^{2+} -Pufferkapazität der Zelle überschritten wird und die

Zelle geschädigt werden kann. Deshalb müssen schnelle Mechanismen existieren, die cng-Kanäle wieder zu schließen.

Sehr hohe Kanaldichten von cng-Kanälen existieren in den Außensegmenten von Photorezeptoren ($100-500 / \mu\text{m}^2$) sowie in den Zilien der olfaktorischen Neuronen (bis zu $1500 / \mu\text{m}^2$; Haynes *et al.*, 1986; Zimmerman & Baylor, 1986; Cook *et al.*, 1989; Kurahashi & Kaneko, 1991). Für die cng-Kanäle dieser Zellen gibt es einige Hinweise auf Inaktivierungsmechanismen. Bei der Aktivierung von Riechzellen durch Duftstoffe beobachtet man beispielsweise eine vollständige Inaktivierung des Rezeptorstromes innerhalb weniger Sekunden (Kurahashi & Shibuya, 1990). Kurahashi & Shibuya (1990) zeigten überdies, daß diese Inaktivierung selbst Ca^{2+} -abhängig war: In Abwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_a$ war die Inaktivierung nicht mehr zu beobachten.

4.6 Physiologische Bedeutung

cng-Kanäle unterscheiden sich beträchtlich in ihrer Ca^{2+} -Leitfähigkeit. Im folgenden soll diskutiert werden, inwieweit die cng-Kanäle zu den beschriebenen physiologischen Eigenschaften der Zellen, in denen sie exprimiert werden, beitragen.

4.6.1 cng-Kanäle in der Olfaktion: Liefern sie nur ein Ca^{2+} -Triggersignal?

Für olfaktorische sensorische Neuronen (OSN) konnte gezeigt werden, daß einige Duftstoffe eine G-Protein vermittelte Enzymkaskade aktivieren, die zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels führt (Reed, 1992; Breer *et al.*, 1994; Zufall *et al.*, 1994). cAMP öffnet die in der Zilienmembran gelegenen cng-Kanäle, so daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen können, und die Zelle depolarisiert. Darüberhinaus aktiviert das einfließende Ca^{2+} Cl^- -Kanäle. Der Cl^- -Strom verstärkt die Riechantwort und kann bis zu 75% des Rezeptorstromes tragen (Kleene, 1993; Kurahashi & Yau, 1993; Lowe & Gold, 1993). Die α -Untereinheit des cng-Kanals aus OSN des Rindes kann bei millimolaren extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen einen reinen Ca^{2+} -Strom tragen (Frings *et al.*, 1995). Die hier gefundene hohe Ca^{2+} -Leitfähigkeit des cng-Kanals aus OSN weist darauf hin, daß

es vielleicht die Hauptaufgabe dieses Kanals ist, ein Ca^{2+} -Triggersignal für die Aktivierung des Cl^- -Stromes zu liefern.

4.6.2 Sehstäbchen und -zapfen unterscheiden sich in ihrer Ca^{2+} -Homöostase

Die Lichtantwort von Sehstäbchen und Zapfen unterscheidet sich in einigen wichtigen Merkmalen. So sind Zapfen etwa 30-100fach weniger lichtempfindlich als Sehstäbchen. Außerdem ist die Kinetik der Lichtantwort von Zapfen deutlich schneller als die der Sehstäbchen. Die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ scheint dagegen in beiden Sehzelltypen ähnlich zu sein (Korenbrod, 1995). Da die cng-Kanäle aus Zapfen eine höhere Ca^{2+} -Leitfähigkeit haben als die Sehstäbchenkanäle, bedeutet das, daß die Transportmechanismen, die das Ca^{2+} aus dem Zytoplasma entfernen, in Sehzapfen effektiver arbeiten müssen als in Sehstäbchen. Ob dies durch verstärkte Aktivität oder höhere Dichte des $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ Austauschers erreicht wird, ist nicht bekannt. Werden nun durch Licht cng-Kanäle geschlossen, kommt es durch die verbleibende Austauschertätigkeit im Zapfenaußensegment zu einem deutlich schnelleren Absinken von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als im Sehstäbchenaußensegment. Alle Ca^{2+} -abhängigen Prozesse, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, sind schnelleren Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterworfen. Insbesondere die cGMP-Synthese wird durch das Absinken von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöht. Damit werden cng-Kanäle erneut aktiviert und die Zelle in den ursprünglichen Dunkelzustand überführt. Somit kann man die unterschiedliche Kinetik der Lichtantwort in Zapfen und Sehstäbchen zumindest teilweise durch die unterschiedliche Ca^{2+} -Leitfähigkeit der cng-Kanäle erklären.

4.6.3 cng-Kanäle in anderen Zellen und Geweben

Die hier untersuchten Photorezeptorkanäle und der Kanal aus OSN sind inzwischen auch in anderen Zellen und Zellstrukturen gefunden worden (Übersicht: Eismann *et al.*, 1993; Yau, 1994, Finn *et al.*, 1996). Die große Ca^{2+} -Permeabilität von *bccngc*α und *bocngc*α könnte auch dort von Bedeutung sein.

So wurden cng-Kanäle auch in der synaptischen Endigung von Zapfen gefunden (Rieke & Schwartz, 1994). Die Ausschüttung von Neurotransmittern durch Exozytose synaptischer Vesikel ist stark Ca^{2+} -abhängig. Ist die Zelle depolarisiert, kann ein genügend großer Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle erfolgen. Bei negativen Membranspannungen, wie sie jedoch bei Belichtung in Zapfen erreicht werden, sind diese Kanäle aber inaktiv. Hier können cng-Kanäle durch ihre hohe Ca^{2+} -Leitfähigkeit den Spannungsbereich, bei dem eine Transmitterfreisetzung stattfinden kann, erweitern. Eine analoge Funktion von cng-Kanälen in Endfüßchen von Sebstäbchen konnte nicht nachgewiesen werden (Rieke & Schwartz, 1994).

Auch in Spermien wurden cng-Kanäle gefunden. Ihre Rolle ist noch nicht ganz klar, aber sie könnten an der Chemotaxis oder an der Akrosomenreaktion beteiligt sein (Weyand *et al.*, 1994). Beide Prozesse sind stark Ca^{2+} -abhängig. Auch hier könnte die wesentliche Funktion des Kanals sein, ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal zu vermitteln. Besonders interessant ist die Beobachtung, daß in Rinderspermien sowohl homooligomere als auch heterooligomere Kanäle vorliegen könnten. Während die α -Untereinheiten im gesamten Schwanzbereich immunzytochemisch nachgewiesen werden konnten, scheint die β -Untereinheit nur im „principal piece“ des Spermienschwanzes vorzuliegen (Weiner, 1996). Die Aktivierung von cng-Kanälen in Spermien könnte aufgrund der verschiedenen Ca^{2+} -Leitfähigkeiten von homo- und heterooligomeren Kanälen zu einem lokal unterschiedlich großen Ca^{2+} -Einstrom in den Spermienschwanz führen. Dadurch würde ein räumliches Ca^{2+} -Konzentrationsmuster entlang des Spermienschwanzes entstehen.

5 Zusammenfassung

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (cng-Kanäle) sind Kationenkanäle, die in der Signaltransduktion verschiedener sensorischer und nicht-sensorischer Zellen eine bedeutende Rolle spielen. Sie leiten sowohl mono- als auch divalente Kationen. Während divalente Kationen durch den Kanal fließen, blockieren sie gleichzeitig spannungs- und dosisabhängig den Strom monovalenter Kationen. Da Ca^{2+} für die Signaltransduktion und Adaptation von Zellen sehr wichtig ist, sollte die Wechselwirkung von cng-Kanälen mit Ca^{2+} -Ionen genauer untersucht werden. Es wurden α -Untereinheiten von verschiedenen cng-Kanälen heterolog exprimiert und in der outside-out Konfiguration elektrophysiologisch untersucht. Obwohl ihre Aminosäuresequenzen im Porenbereich sehr ähnlich sind, unterscheiden sich die untersuchten α -Untereinheiten deutlich in ihrer Ca^{2+} -Blockierbarkeit. Die Sebstäbchenkanäle werden am stärksten durch extrazelluläres Ca^{2+} blockiert, danach folgen die Kanäle der Sehzapfengruppe und anschließend die Kanäle aus dem olfaktorischen Epithel. Aus dem Verlauf der Spannungsabhängigkeit dieser Blockierung kann geschlossen werden, daß die α -Untereinheiten aus Sebstäbchen viel weniger Ca^{2+} transportieren als die entsprechenden α -Untereinheiten aus Zapfen und aus OSN. Der *Drosophila*-Kanal zeigt bei negativen Spannungen die geringste Blockierbarkeit durch Ca^{2+} und trägt den größten Ca^{2+} -Strom. Die Spannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Blockierung verschiedener Kanäle konnte durch ein einfaches kinetisches Modell beschrieben werden, das die Interpretation der unterschiedlichen Leitfähigkeiten unterstützt.

Um die Proteinbereiche in den cng-Kanälen zu identifizieren, die die Ca^{2+} -Wechselwirkung beeinflussen, wurden in verschiedene α -Untereinheiten Mutationen eingeführt und die Eigenschaften der Mutanten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß Unterschiede in der Aminosäuresequenz im unmittelbaren Porenbereich nicht für die unterschiedliche Blockierbarkeit der α -Untereinheiten verantwortlich sind. Der Bereich, der die transmembranalen Segmente S_5 und S_6 und die dazwischenliegende Pore einschließt (S_5 -P- S_6) wurde in einem Chimärenprojekt als allein bestimmend für die charakteristische Wechselwirkung von Ca^{2+} mit der cng-Kanalpore identifiziert. Innerhalb dieses Bereiches bewirken viele der untersuchten Aminosäureaustausche jeweils kleine Veränderungen in der Blockierbarkeit. Es konnte gezeigt werden, daß der Bereich S_5 -P- S_6 das Protonierungsmuster und möglicherweise auch die Koordinationsgeometrie der Ca^{2+} -Bindestelle in der Pore beeinflußt.

Die Eigenschaften homooligomerer cng-Kanäle und spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle weisen viele Übereinstimmungen hinsichtlich der Wechselwirkungen mit Ca^{2+} auf. Ein Modell für Ca^{2+} -Kanäle, nach dem im Porenbereich gleichzeitig mehrere Ca^{2+} -Ionen binden können, wurde auf cng-Kanäle angewendet. Dieses Modell erklärt die Wechselwirkungen von Ca^{2+} mit cng-Kanälen und beschreibt deren Permeationseigenschaften.

Im Gegensatz zu Ca^{2+} -Kanälen und α -homooligomeren cng-Kanälen werden heterooligomere Kanäle aus α - und β -Untereinheiten weniger stark von Ca^{2+} Ionen blockiert und leiten deshalb größere Na^+ -Ströme. cng-Kanäle *in situ* können deshalb, in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung, einerseits der elektrischen Erregbarkeit, andererseits als Ca^{2+} -Einstromquelle dienen.

6 Literatur

- Ahmad, I., Korbmacher, C., Segal, A.S., Cheung, P., Boulpaep, E.L. & Barnstable, C.J. (1992) Mouse cortical collecting duct cells show nonselective cation channel activity and express a gene related to the cGMP-gated rod photoreceptor channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10262-10266.
- Ahmad, I., Leinders-Zufall, T., Kocsis, J.D., Shepherd, G.M., Zufall, F. & Barnstable, C.J. (1994) Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors. *Neuron* **12**: 155-165.
- Altenhofen, W. (1995) Aktivierung heterolog exprimierter α -Untereinheiten zyklisch-Nukleotid gesteuerter Ionenkanäle durch Agonisten. Dissertation Universität Tübingen.
- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1991) Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9868-9872.
- Anholt, R.R.H. & Rivers, A.M. (1990) Olfactory transduction: Cross-talk between second-messenger systems. *Biochemistry* **29**: 4049-4054.
- Barth, L.G. & Barth, L.J. (1959) Differentiation of the cell of *Rana pipiens* gastrula in unconditioned medium. *J. Embryol. Exp. Morph.* **7**: 210-222.
- Baumann, A., Frings, S., Godde, M., Seifert, R. & Kaupp, U.B. (1994) Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO J.* **13**: 5040-5050.
- Bauer, P.J. (1981) Affinity and stoichiometry of calcium binding by Arsenazo III. *Anal. Biochem.* **100**: 61-72.
- Bers, D.M. (1982) A simple method for the accurate determination of free [Ca] in Ca-EGTA solutions. *Amer. J. Physiol.* **242**: C404-C408.
- Bers, D.M., Patton, C.W. & Nuccitelli, R. (1994) A practical guide to the preparation of Ca^{2+} buffers. *Meth. Cell Biol.* **40**: 3-29.
- Biel, M., Altenhofen, W., Hullin, R., Ludwig, J., Freichel, M., Flockerzi, V., Dascal, N., Kaupp, U.B. & Hofmann, F. (1993) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett.* **329**: 134-138.

- Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3505-3509.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. & Hofmann, F. (1996) Molecular cloning and expression of a modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J. Biol. Chem.* **271**: 6349-6355.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. (1993) Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* **10**: 865-877.
- Borisy, F.F., Ronnett, G.V., Cunningham, A.M., Juilfs, D., Beavo, J. & Snyder, S.H. (1992) Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **12**: 915-923.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H.A. & Zinn, K. (1994) Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: A new subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8890-8894.
- Breer, H., Raming, K. & Krieger, J. (1994) Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **1224**: 277-287.
- Chen, T.-Y. & Yau, K.-W. (1994) Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* **368**: 545-548.
- Chen, T.-Y., Illing, M., Molday, L.L., Hsu, Y.-T., Yau, K.-W. & Molday, R.S. (1994) Subunit 2 (or β) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11757-11761.
- Chen, T.-Y., Peng, Y.-W., Dhallan, R.S., Ahamed, B., Reed, R.R. & Yau, K.-W. (1993) A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* **362**: 764-767.
- Choi, E.-J., Xia, Z. & Storm, D.R. (1992) Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* **31**: 6492-6498.
- Cook, N.J., Hanke, W. & Kaupp, U.B. (1987) Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 585-589.

- Cook, N.J., Molday, L.L., Reid, D., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1989) The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**: 6996-6999.
- Cooper, E., Couturier, S. & Ballivet, M. (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**: 235-238.
- Devillers-Thiéry, A., Galzi, J.L., Eiselé, J.L., Bertrand, S., Bertrand, D. & Changeux, J.P. (1993) Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: A prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membr. Biol.* **136**: 97-122.
- Dhallan, R.S., Macke, J.P., Eddy, R.L., Shows, T.B., Reed, R.R., Yau, K.-W. & Nathans, J. (1992) Human rod photoreceptor cGMP-gated channel: Amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *J. Neurosci.* **12**: 3248-3256.
- Dhallan, R.S., Yau, K.-W., Schrader, K.A. & Reed, R.R. (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**: 184-187.
- Eismann, E., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1993) Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. *Cell. Physiol. Biochem.* **3**: 332-351.
- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. & Kaupp, U.B. (1994) A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca^{2+} blockage and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1109-1113.
- Fabiato, A. (1988) Computer programmes for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Meth. Enzymol.* **157**: 378-417.
- Falke, J.J., Drake, S.K., Hazard, A.L. & Peersen, O.B. (1994) Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **27**: 219-290.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*. New York.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**: 310-313.
- Finn, J.T., Grunwald, M.E. & Yau, K.-W. (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 395-426.
- Frings, S. (1993) Protein kinase C sensitizes olfactory adenylate cyclase. *J. Gen. Physiol.* **101**: 183-205.

- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. & Kaupp, U.B. (1995) Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**: 169-179.
- Godde, M. (1996) Elektrophysiologische Charakterisierung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen sowie biophysikalische Untersuchungen zur Signaltransduktion in Spermien. Dissertation Universität Regensburg.
- Goldman, D.E. (1943) Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* **27**: 37-60.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995) Subunit interactions in coordination of Ni^{2+} in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10222-10226.
- Gordon, S.E., Downing-Park, J. & Zimmerman, A.L. (1995) Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory factor. *J. Physiol.* **486**: 533-546.
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. & Chess, A. (1992) Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**: 45-58.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R., Liu, D. & Siegelbaum, S.A. (1993) Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels. *Nature* **364**: 61-64.
- Gurdon, J.B. (1974) *The Control of Gene Expression in Animal Development*. Oxford.
- Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991) Similarities in amino acid sequences of *Drosophila eag* and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**: 730
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100.
- Haynes, L.W. & Yau, K.-W. (1985) Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* **317**: 61-64.
- Haynes, L.W., Kay, A.R. & Yau, K.-W. (1986) Single cyclic GMP-activated channel activity in excised patches of rod outer segment membrane. *Nature* **321**: 66-70.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992) A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K^+ channels. *Science* **258**: 1152-1155.

- Henn, D.K., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1995) Probing of the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated channels by a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7425-7429.
- Hess, P. & Tsien, R.W. (1984) Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**: 453-456.
- Hille, B. (1979) Rate theory models for ion flow in ionic channels of nerve and muscle. In: *Membrane Transport Processes, Vol. 3*. Stevens, C.F. & Tsien, R.W. (Hrsg.), New York, 5-16.
- Hille, B. (1992) *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland.
- Hodgkin, A.L. & Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* **108**: 37-77.
- Hodgkin, A.L. & Keynes, R.D. (1955) The potassium permeability of a giant nerve fiber. *J. Physiol.* **128**: 61-88.
- Hsu, Y.-T. & Molday, R.S. (1993) Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. *Nature* **361**: 76-79.
- Hsu, Y.-T. & Molday, R.S. (1994) Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 29765-29770.
- Huang, S.H., Pittler, S.J., Huang, X., Oliveira, L., Berson, E.L. & Dryja, T.P. (1995) Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the α subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nature Gen.* **11**: 468-471.
- Ikura, M. (1996) Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 14-17.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1990) A superfamily of ion channels. *Nature* **345**: 672
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* **371**: 119-122.
- Kaupp, U.B. & Koch, K.-W. (1992) Role of cGMP and Ca^{2+} in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 153-175.
- Kaupp, U.B. (1991) The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci.* **14**: 150-157.
- Kaupp, U.B. (1995) Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opinion Neurobiol.* **5**: 434-442.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989) Primary

- structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**: 762-766.
- Kawamura, S. & Murakami, M. (1991) Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature* **349**: 420-423.
- Kawamura, S. (1993) Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* **362**: 855-857.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. & Goldstein, S.A.N. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**: 690-695.
- Kim, M.-S., Morii, T., Sun, L.-X., Imoto, K. & Mori, Y. (1993) Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett.* **318**: 145-148.
- Kleene, S.J. (1993) Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* **11**: 123-132.
- Kleene, S.J. (1995) Block by external calcium and magnesium of the cyclic-nucleotide-activated current in olfactory cilia. *Neuroscience* **66**: 1001-1008.
- Koch, K.-W. & Kaupp, U.B. (1985) Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**: 6788-6800.
- Koch, K.-W. & Stryer, L. (1988) Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* **334**: 64-66.
- Körschen, H.G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dosé, A., Godde, M., Molday, L., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1995) A 240 kDa protein represents the complete β -subunit of cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptors. *Neuron* **15**: 627-636.
- Korenbrodt, J.I. (1995) Ca^{2+} flux in retinal rod and cone outer segments: differences in Ca^{2+} selectivity of the cGMP-gated ion channels and Ca^{2+} clearance rates. *Cell Calcium* **18**: 285-300.
- Kumar, V.D. & Weber, I.T. (1992) Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel. *Biochemistry* **31**: 4643-4649.
- Kuo, C.-C. & Hess, P. (1993a) Ion permeation through the L-type Ca^{2+} channel in rat pheochromocytoma cells: Two sets of ion binding sites in the pore. *J. Physiol.* **466**: 629-655.

- Kuo, C.-C. & Hess, P. (1993b) Characterization of the high-affinity Ca^{2+} binding sites in the L-type Ca^{2+} channel pore in rat pheochromocytoma cells. *J. Physiol.* **466**: 657-682.
- Kurahashi, T. & Kaneko, A. (1991) High density cAMP-gated channels at the ciliary membrane in the olfactory receptor cell. *NeuroReport* **2**: 5-8.
- Kurahashi, T. & Shibuya, T. (1990) Ca^{2+} -dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt. *Brain Res.* **515**: 261-268.
- Kurahashi, T. & Yau, K.-W. (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* **363**: 71-74.
- Lagnado, L. & Baylor, D. (1992) Signal flow in visual transduction. *Neuron* **8**: 995-1002.
- Lagnado, L. & Baylor, D.A. (1994) Calcium controls light-triggered formation of catalytically active rhodopsin. *Nature* **367**: 273-277.
- Läuger, P. (1973) Ion transport through pores: A rate-theory analysis. *Biochim. Biophys. Acta* **311**: 423-441.
- Levenberg, K. (1944) A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Q. Appl. Math.* **2**: 164-168.
- Liman, E.R. & Buck, L.B. (1994) A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13**: 611-621.
- Liman, E.R., Tytgat, J. & Hess, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K^+ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**: 861-871.
- Liu, D.T., Tibbs, G.R. & Siegelbaum, S.A. (1996) Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* **16**: 983-990.
- Liu, M., Chen, T.-Y., Ahamed, B., Li, J. & Yau, K.-W. (1994) Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science* **266**: 1348-1354.
- Lo, Y.H., Bradley, T.M. & Rhoads, D.E. (1993) Stimulation of Ca^{2+} -regulated olfactory phospholipase C by amino acids. *Biochemistry* **32**: 12358-12362.
- Lopez, G.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1994) Evidence that the S6 segment of the *Shaker* voltage-gated K^+ channel comprises part of the pore. *Nature* **367**: 179-182.
- Lowe, G. & Gold, G.H. (1993) Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**: 283-286.

- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U.B. (1990) Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**: 24-29.
- MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**: 232-235.
- MacKinnon, R. (1995) Pore Loops: An emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**: 889-892.
- Massey, S.C. (1990) Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In: *Progress in Retinal Research* 9. Osborne, N. & Chader, J. (Hrsg.), Oxford, 399-425.
- McCleskey, E.W. (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 304-312.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S. & Sakmann, B. (1986) Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Arch.* **407**: 577-588.
- Miller, J.L. & Korenbrot, J.I. (1994) Differences in calcium homeostasis between retinal rod and cone photoreceptors revealed by the effects of voltage on the cGMP-gated conductance in intact cells. *J. Gen. Physiol.* **104**: 909-940.
- Miller, J.L., Picones, A. & Korenbrot, J.I. (1994) Differences in transduction between rod and cone photoreceptors: an exploration of the role of calcium homeostasis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 488-495.
- Molday, R.S., Molday, L.L., Dose, A., Clark-Lewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E. & Kaupp, U.B. (1991) The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell: characterization and orientation of the amino terminus. *J. Biol. Chem.* **266**: 21917-21922.
- Nakamura, T. & Gold, G.H. (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444.
- Nakatani, K. & Yau, K.-W. (1988) Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J. Physiol.* **395**: 695-729.
- Nakatani, K. & Yau, K.-W. (1989) Sodium-dependent calcium extrusion and sensitivity regulation in retinal cones of the salamander. *J. Physiol.* **409**: 525-548.
- Nakatani, K., Koutalos, Y. & Yau, K.-W. (1995) Ca^{2+} modulation of the cGMP-gated channel of bullfrog retinal rod photoreceptors. *J. Physiol.* **484**: 69-76.

- Nawy, S. & Jahr, C.E. (1990) Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* **346**: 269-271.
- Neher, E. & Augustine, G.J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* **450**: 273-301.
- Nichols, C.G. (1993) The 'inner core' of inwardly rectifying K⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 320-323.
- Park, C.-S. & MacKinnon, R. (1995) Divalent cation selectivity in a cyclic nucleotide-gated ion channel. *Biochemistry* **34**: 13328-13333.
- Perry, R.J. & McNaughton, P.A. (1991) Response properties of cones from the retina of the tiger salamander. *J. Physiol.* **433**: 561-587.
- Pittler, S.J., Lee, A.K., Altherr, M.R., Howard, T.A., Seldin, M.F., Hurwitz, R.L., Wasmuth, J.J. & Baehr, W. (1992) Primary structure and chromosomal localization of human and mouse rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Biol. Chem.* **267**: 6257-6262.
- Pugh, E.N.J. & Lamb, T.D. (1993) Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1141**: 111-149.
- Quandt, F.N., Nicol, G.D. & Schnetkamp, P.P.M. (1991) Voltage-dependent gating and block of the cyclic-GMP-dependent current in bovine rod outer segments. *Neuroscience* **42**: 629-638.
- Ranganathan, R. (1994) Evolutionary origins of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3484-3486.
- Reed, R.R. (1992) Signaling pathways in odorant detection. *Neuron* **8**: 205-209.
- Rieke, F. & Schwartz, E.A. (1994) A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron* **13**: 863-873.
- Root, M.J. & MacKinnon, R. (1993) Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel. *Neuron* **11**: 459-466.
- Root, M.J. & MacKinnon, R. (1994) Two identical noninteracting sites in an ion channel revealed by proton transfer. *Science* **265**: 1852-1856.
- Sather, W.A., Yang, J. & Tsien, R.W. (1994) Structural basis of ion channel permeation and selectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**: 313-323.
- Schneggenburger, R., Zhou, Z., Konnerth, A. & Neher, E. (1993) Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* **11**: 133-143.

- Sesti, F., Eismann, E., Kaupp, U.B., Nizarri, M. & Torre, V. (1995) The multi-ion nature of cGMP-gated channel from vertebrate rods. *J. Physiol.* **487**: 17-36.
- Slesinger, P.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1993) The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channels. *Neuron* **11**: 739-749.
- Smith, R.M. & Martell, A.E. (1989) *Critical Stability Constants Vol. 6*. New York
- Stern, J.H., Kaupp, U.B. & MacLeish, P.R. (1986) Control of the light-regulated current in rod photoreceptors by cyclic GMP, calcium, and *l-cis*-diltiazem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1163-1167.
- Strong, M., Chandy, K. & Gutman, G.A. (1993) Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: On the origin of electrical excitability. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 221-241.
- Stryer, L. (1991) Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* **266**: 10711-10714.
- Sugimoto, Y., Yatsunami, K., Tsujimoto, M., Khorana, H.G. & Ichikawa, A. (1991) The amino acid sequence of a glutamic acid-rich protein from bovine retina as deduced from the cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3116-3119.
- Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. & Titani, K. (1984) Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* **23**: 4207-4218.
- Torre, V. & Menini, A. (1994) Selectivity and single channel properties of the cGMP-activated channel in amphibian retinal rods. In: *Handbook of Membrane Channels: Molecular and Cellular Physiology*. Peracchia, C. (Hrsg.), San Diego, 345-358.
- Torre, V., Straforini, M., Sesti, F. & Lamb, T.D. (1992) Different channel-gating properties of two classes of cyclic GMP-activated channel in vertebrate photoreceptors. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **250**: 209-215.
- Trouslard, J., Marsh, S.J. & Brown, D.A. (1993) Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells. *J. Physiol.* **468**: 53-71.
- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. & Rosenberg, R.L. (1987) Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**: 265-290.
- Tsien, R.Y. & Rink, T.J. (1980) Neutral carrier ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular free calcium. *Biochim. Biophys. Acta* **599**: 623-638.

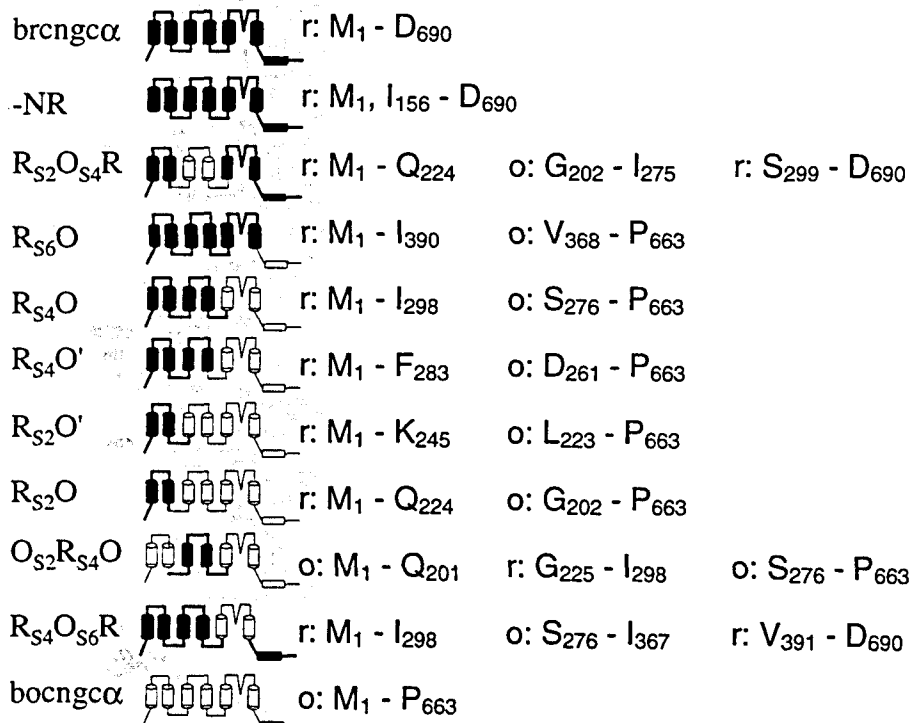
- Vernino, S., Rogers, M., Radcliffe, K.A. & Dani, J.A. (1994) Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **14**: 5514-5524.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987) Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**: 343-351.
- Weiner, J. (1996) *Molekularbiologische, immunologische und funktionelle Charakterisierung von Untereinheiten des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals aus dem Rinderhoden*. Jülich (im Druck).
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. & Kaupp, U.B. (1994) Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**: 859-863.
- Wohlfart, P., Müller, H. & Cook, N.J. (1989) Lectin binding and enzymatic deglycosylation of the cGMP-gated channel from bovine rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **264**: 20934-20939.
- Woodhull, A.M. (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* **61**: 687-708.
- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.-F. & Tsien, R.W. (1993) Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature* **366**: 158-161.
- Yau, K.-W. & Baylor, D.A. (1989) Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**: 289-327.
- Yau, K.-W. (1994) Cyclic nucleotide-gated channels: An expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3481-3483.
- Yau, K.-W. (1994) Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **35**: 9-32.
- Zhou, Z. & Neher, E. (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch.* **425**: 511-517.
- Zimmerman, A.L. & Baylor, D.A. (1986) Cyclic GMP-sensitive conductance of retinal rods consists of aqueous pores. *Nature* **321**: 70-72.
- Zufall, F., Firestein, S. & Shepherd, G.M. (1994) Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 577-607.

Anhang A.1: Sequenzvergleich von α -Untereinheiten verschiedener cng-Kanäle

brngca	MKKVIINTWHSFVNIPNVVGPDEKEITRMENGACSSFSG---DDDSASMFESEETENPHARDSFRSNTHGSGQPSQRE	77
crngca	MKVGVIEHHSHPIIPSVV-----QDSED-----PGLIEKGE-NRF	37
bcngca	MAK--ISTQYSHPTRTTHPSVRTMDRDLDCIENGL-SRTHLPC--EETSSSELQEGIAMETRGLAES-RQSSFTSQGP-TRL	73
ccngca	MAK--INTQHSYPMHGLSVRTTDEDIERIENG-IRTHSLC--EDTSSSELQVRISMGRHLSGS-QTSPFTGRGAMARL	74
boengca	MTEKANGVKSSPANNHHHAPPAIKASGKDDHRASSRPQSA--DDTSSSELQQLAEMD-----APQQRRCGFRRI	69
dmngca	MRHFVKVAMVQSLDI---SAITG-----QQTDAERSKRSPALRRTL---QALRQLTKRNR-	52
<hr/>		
brngca	QYL-----PGAIALFNVNNSNKEQEPKE	101
crngca	ARQWYL-----PGAFAQYNINNNNSNKDEEKKK	64
bcngca	SRLIISLRAWSAHRLHQEDQRPDSFLERFRGAELQEVSSRESHVQFNVGSQEPDRGRSAWPLARNNTNCTNNSEKDDKA	153
ccngca	SRFVVSLSRWATHRLHHEDQRPDSFLERIRGPELLEVSSRQSNIRSLGIREQPGGVNGPWPLARFNVNFSNNTNEDKKE	154
boengca	ARLVGVLEWAYRNFRREEPRPDSFLERFRGPELHTVTTQGG-----DGKGD	116
dmngca	-----PKPPDWLEKFSNTTNTDKIRKGC-----PAMEDAALSSEIRGSSVLC--	95
<hr/>		
S1		
brngca	KKKKKKKKSKPDDKNENKKDPEKKKKKKDKKKKKKEEGKDKKEEKEVVIDPSGNTYYNWLFCITLPVYMWNTMI	181
crngca	KKEKKSKSENKKDGERQNKKEKKHKNKDKKKGKEEKKK-----DIFIIDPAGNMYNWLFCITMPVYMWNTMI	135
bcngca	KKEEKKKEEKKENPKKEEKKK-----DSVMDPSSNMYHNLTVIAPVFYMWCLL	205
ccngca	EKKEVKEEKKKEEKKKEKKDDKKDDKKDDKKKEEQKK-----EVFVIDPSSNMYNWLTIAPVFYMWCLL	228
boengca	KDGECKGTTKKF-----ELFVLDPAGDWYRWLFIALPVLNWLCLL	158
dmngca	-----NRLSVDPTLQSHYRWLAIVSLAVLYNIIFV	125
<hr/>		
S2		
brngca	IARACFDELQSDYLEWLAFDYLSVVYLLDMFVRTRTGYLEQGLLVKEERKLIDKYKSTFQKLDVLSIPTDLLYIKF	261
crngca	IARACFDELQNDYLAWFVVDYVSDVIYIADMVVRTRTGYLEQGLLVKEEQKLKEKYSSLQKLDVLSIPTDLLYIKF	215
bcngca	VCACFDELQSEHMLWLVLVDYSADILYGMMLVLRARTGFLEQGLMVMDASRLWKHYTQTLHFKLDVLSIPTDLAYFKL	285
ccngca	ICACFDELQIDHKLWFLDYCSDIYVDFMFRFRTGFLEQGLLVKDEKKLRDHYTQTVQKLDVLSIPTDLAYLKL	308
boengca	VARACFSDLQKGYIWLVLVDYVSDVYIADLFIRLRTGFLEQGLLVKDTKKLRDNYIHTMQKLDVASIPTDLIYFAV	238
dmngca	VGRAVFWIINKSAPAFWYTLDYLCDFIYLLDTLVHMHGFLDQGLLVRAFPVRRHYFHTKGWYLDVLSMLPTDLAYIWW	205
<hr/>		
S4		
brngca	QWNYPEI-----RLNRLRISRMFEFFQRTETRTNYPNIFRISNLVMIYIIIIHWNACVYFISKAIGFNDT	329
crngca	GLNYPEL-----RINRLRVARMEFFQRTETRTNYPNIFRISNLVMIYVIIHWNACVYFISKAIGFADT	283
bcngca	GMNYPEL-----RFNRLKLARLFEFFDRTETRTNYPNIFRISNLVLYIIIIHWNACIYFAISKVIGFGTDS	353
ccngca	GLNYPEL-----RFNRLRIARLFEFFDRTETRTNYPNIFRISNLVLYIIIIHWNACIYFAISKVIGFGTDS	376
boengca	GIHNPV-----RFNRLHFARMFEFFDRTETRTNYPNIFRISNLVLYIIIIHWNACIYFAISKVIGFGTDS	306
dmngca	P---PETCSSLYLPCPVIRLNRLLRINRLWEFDRTEATGYPNAFRICKVLAIVLIIHWNACMYFAISYEIGFSSDS	282
<hr/>		
S6		
brngca	WVYPDVNDPDFGLARKVYVSLYWSLTLTTIGETPPPVVDSEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNAARAEFQ	409
crngca	WVYPNTSHPEFARLTKRYVSLYWSLTLTTIGETPPPVVDSEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNAARAEFQ	363
bcngca	WVYPNVSNPEYGRLSRKYIYSLYWSLTLTTIGETPPPVVDSEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNASRAEFQ	433
ccngca	WVYPNVSIPEYGRLSRKYIYSLYWSLTLTTIGETPPPVVDSEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNASRAEFQ	456
boengca	WVYPNITDPEYGLSREYIYCLYWSLTLTTIGETPPPVVDSEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNATRAEFQ	386
dmngca	WVYNLNG-TRNNTLQRQYISFYWSLTLTTIGETPTPENDVEYFFVVDLFGVLIFATIVGNIGSMISNMNVARVEFQ	361
<hr/>		
brngca	ARIDAIKQYMHFRNVSKDMEKRVIKWFDYLTWNKKTVDEREVLKYLDPKLRAEIAINVHDLTKKVRIFQDCEAGLLVEL	489
crngca	AKIDAIKQYMHFRNVSKDMEKRVIKWFDYLTWNKKAVDEREVLKYLDPKLRAEIAINVHDLTKKVRIFQDCEAGLLVEL	443
bcngca	AKIDSIKQYMQFRKVTDLTRVIRWFDYLTWNKKTVDEKVLKSLDPKLKAEIAINVHDLTKKVRIFQDCEAGLLVEL	513
ccngca	AKVDSIKQYMHFRKVTDLTRVIRWFDYLTWNKKTVDEKVLKSLDPKLKAEIAINVHDLTKKVRIFQDCEAGLLVEL	536
boengca	AKIDAVKHYMQFRKVSKEAKVIRWFDYLTWNKKSVDEREVLKSLPAKLRAEIAINVHDLTKKVRIFQDCEAGLLVEL	466
dmngca	NRMGVKQYMAFRVGHLEARVIRWFAWTSQSGALDEERVAALPKLKAELIQVHMDTLKQVRIFHOTEPCGLLEAL	441
<hr/>		
cGMP-Bindestelle		
brngca	VLKLQPVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGITQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIKSIGYS	569
crngca	VLKLQPVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIRSIGYS	523
bcngca	VLKLRAVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIRSIGYS	593
ccngca	VLKLKPTVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIRSIGYS	616
boengca	VLKLQPVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIRSIGYS	546
dmngca	VLKLKQVQSPGDYICKKGDIGREMYIIEGKLAVVADGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIRSIGYS	521
<hr/>		
brngca	DLFCLSKDDLMEALTEYPDAGMLEEKGQILMKDGLLDINIANAGSDPKDLEEK-VTRMESSVDLLQTRFARILAEYES	648
crngca	DLFCLSKDDLMEALTEYPDAGMLEEKGQILMKDGLLDIEVANLGSOPKDLEEK-VAYMEGSMRDLQTKFARLLAEYDA	602
bcngca	DLFCLSKDDLMEALTEYPAKKALEEKGRQILMKDNLIDEELAKAGADPKDLEEK-VEHLETSLDSLQTRFARLLAEYNA	672
ccngca	DLFCLSKDDLMEALTEYPAKKALEEKGRQILMKDNLIDEELAKAGADPKDLEEK-IDRLETALDTLQTRFARLLAEYSS	695
boengca	DLFCLSKDDLMEALTEYPDARKVLEERGREILMKEGLLDENEVAASME-VDVQEK-LEQLETNMDTLTYTRFARLLAEYTG	624
dmngca	DLFCLAKRDLWETLSDYPEARSTLTQRCQLLRKDGLLDEQIFADSQRVHDSIEGGIEKLELSVENLNMRLAPLLAEYTA	601
<hr/>		
brngca	MQQKLKQRLTKVEKFLKPLIDTEFSAIEGSGTESGPTDSTQD-----	690
crngca	AQQKLKRLTQIEKILKPVMEQEFDFEADPPTDKPGVTKTE-----	645
bcngca	TQMKVKQRLSQLESQVKMGLPPGDAPQTEASQP-----	706
ccngca	SQKQVKQRLARVETRKKYSGSLSVGEPEPEKPEEQKKD-----	735
boengca	AQQKLKQRLTVLETKMKQNNEDSLSDGMNSPEPPAEKP-----	663
dmngca	SQAKIKQRLAKLEMNGPGTWRLECEPQSRARSGRLYSLQPKRRPRSRPDATKSSDARKQNTL	665









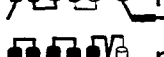



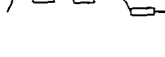
Anhang A.2: Chimären zwischen brngcα und bocngcα

Die Chimären zwischen brngcα und bocngcα sind als Piktogramme dargestellt. Die transmembranalen Segmente S₁-S₆ sind als Tonnen dargestellt. Die Porenregion ist durch „v“ gekennzeichnet. Die Lage der cGMP-Bindestelle ist durch einen waagerechten Balken angedeutet. Fusionsanteile aus brngcα sind schwarz, Anteile aus bocngcα sind weiß dargestellt. Rechts sind die jeweiligen Fusionsanteile, aus denen die Chimären zusammengesetzt sind, angegeben. Die erste und die letzte Aminosäure von brngcα (r) und bocngcα (o) sind im 1-Buchstaben-Kode angegeben.



Anhang A.3: Chimären zwischen brngcα und bccngcα

Die Chimären zwischen brngcα und bccngcα sind als Piktogramme dargestellt. Die transmembranalen Segmente S₁-S₆ sind als Tonnen dargestellt. Die Porenregion ist durch „v“ gekennzeichnet. Die Lage der cGMP-Bindestelle ist durch einen waagerechten Balken angedeutet. Fusionsanteile aus brngcα sind schwarz, Anteile aus bccngcα sind weiß dargestellt. Rechts sind die jeweiligen Fusionsanteile, aus denen die Chimären zusammengesetzt sind, angegeben. Die erste und die letzte Aminosäure von brngcα (r) und bccngcα (c) sind im 1-Buchstaben-Kode angegeben.

brngcα		r: M ₁ -D ₆₉₀		
C _{S4} R _{S6} C		c: M ₁ -T ₃₁₂	r: R ₂₈₉ - T ₃₈₉	c: I ₄₁₄ - P ₇₀₆
C _{S5} R _{S6} C		c: M ₁ -I ₃₄₃	r: S ₃₂₀ - T ₃₈₉	c: I ₄₁₄ - P ₇₀₆
C _{S4} R _{S5} C		c: M ₁ -T ₃₁₂	r: R ₂₈₉ - I ₃₁₉	c: S ₃₄₄ - P ₇₀₆
C _{S5} R _{P0} C		c: M ₁ -I ₃₄₃	r: S ₃₂₀ - P ₃₆₇	c: V ₃₉₂ - P ₇₀₆
C _{P0} R _{S6} C		c: M ₁ -P ₃₉₁	r: V ₃₆₈ - T ₃₈₉	c: I ₄₁₄ - P ₇₀₆
R _{S5} C _{P0} R		r: M ₁ -I ₃₁₉	c: S ₃₄₄ - P ₃₉₁	r: V ₃₆₈ - D ₆₉₀
R _{S4} C _{S5} R'		r: M ₁ -T ₂₈₈	c: R ₃₁₃ - S ₃₅₃	r: W ₃₃₀ - D ₆₉₀
R _{S4} C _{S5} R		r: M ₁ -T ₂₈₈	c: R ₃₁₃ - I ₃₄₃	r: S ₃₂₀ - D ₆₉₀
R _{P0} C _{S6} R		r: M ₁ -P ₃₆₇	c: V ₃₉₂ - T ₄₁₃	r: I ₃₉₀ - D ₆₉₀
R _{S5} C _{S6} R		r: M ₁ -I ₃₁₉	c: S ₃₄₄ - T ₄₁₃	r: I ₃₉₀ - D ₆₉₀
R _{S4} C _{S6} R		r: M ₁ -T ₂₈₈	c: R ₃₁₃ - T ₄₁₃	r: I ₃₉₀ - D ₆₉₀
bccngcα		c: M ₁ -P ₇₀₆		

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas, sein persönliches Engagement während der Durchführung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft,
- Dr. M. Godde für die Einführung in die elektrophysiologischen Arbeitsmethoden,
- R. Gauß, Dr. M. Godde, S. Gotzes, Dr. F. Müller, A.Sasse und Dr. I.Weyand für die Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit,
- Dr. S. Frings, Dr. H. Lühring und Dr. F. Müller für ihre hilfreichen Diskussionen und Ratschläge,
- Dr. A. Baumann, Dr. E. Eismann, Dr. H.G. Körschen und J.R. Weiner für die Konstruktion der Mutanten und die Herstellung der *in-vitro*-Transkripte,
- Dr. W. Altenhofen für die Überlassung von Programmen, die die Datenaufnahme und -analyse erheblich vereinfachten,
- C. Dzeja für die Überlassung der P_f -Daten,
- M. Bruns, A. Eckert, H. Erkens, R. Eßer, H.D. Grammig und S. Mund für die technische Unterstützung.

PD Dr. S. Waffenschmidt möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3362
März 1997
ISSN 0944-2952